

**UNTERSUCHUNG DER STABILITÄT DER  
ZELLULÄREN DNA,  
DES DNA-TURNOVERS, UND  
KONZEPTS DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT  
BEI VERSCHIEDENEN EUKARYONTISCHEN  
ZELLSYSTEMEN**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
**Doktors der Naturwissenschaften**  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen  
vorgelegt  
von

**Peter F. Zipfel**

aus Freiburg/Br.

1984



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



**UNTERSUCHUNG DER STABILITÄT DER  
ZELLULÄREN DNA,  
DES DNA-TURNOVERS, UND  
KONZEPTS DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT  
BEI VERSCHIEDENEN EUKARYONTISCHEN  
ZELLSYSTEMEN**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
**Doktors der Naturwissenschaften**  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen  
vorgelegt  
von

**Peter F. Zipfel**

aus Freiburg/Br.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1984

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Kasche

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Hildebrandt

# Gedicht

Immer verweigert sich  
das erste Wort und sträubt sich  
Immer ist es das zweite  
das sich hervortut: das schwächere.  
Es hat einen Sprung  
das hört man am Klang

Das erste Wort wäre so  
wie wenn bei Sonnenaufgang  
das Licht  
durch einen langen steinernen Gang  
zum ersten Mal  
in eine ferne erdbedeckte Kammer  
fielen und sie erhellte

Aber immer drängt sich  
das falsche Wort vor und  
das Innerste der Welt  
bleibt dunkel  
weiterhin.

Günter Kunert

Unterwegs nach Utopia, 1977



## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde

- (i) die strukturelle Stabilität der zellulären DNA und die Existenz des DNA-turnovers bei verschiedenen eukaryontischen Zellsystemen untersucht,
- (ii) Das Konzept der spezifischen Aktivität für die Markierung der DNA mit H-3 und C-14 von anorganischen und organischen Vorstufen wurde theoretisch und experimentell untersucht.

Zur Untersuchung der strukturellen Stabilität der DNA wurden verschiedene, nicht teilende Gewebe der Maus (Muskel, Pankreas) und konfluente Monolayer Zellen verwendet.

Für BHK 21 Zellen konnte gezeigt werden, daß auch in konfluentem Zustand, am achten Tag nach dem Einimpfen, noch replikative DNA-Synthese stattfindet, die durch Hydroxyharnstoff nicht vollständig gehemmt werden konnte.

Bei Zellkulturen wurde die Existenz und der Umfang des DNA-turnovers i.e. die zellzyklus-unabhängige, kontinuierliche DNA-Synthese, bei der Teile der zellulären DNA erneuert werden- mit verschiedenen Methoden untersucht:

- durch einen Vergleich der spezifischen Aktivität der während des exponentiellen Wachstums und während der stationären Phase markierten DNA,
- durch die Trennung der durch replikative DNA-synthese markierten DNA von der parentalen DNA in einem CsCl-Gradienten,
- durch einen Vergleich des Einbaus von H-3dThd auf Zellebene durch Autoradiographie

Der ermittelte Umfang des DNA-turnovers schwankt in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode. Die, nach Korrektur für die durch replikative DNA-synthese markierte DNA, ermittelte Geschwindigkeit des DNA-turnovers beträgt maximal 0.1 % pro Genom und h.

Die möglichen biologischen Funktionen des DNA-turnovers, als Reparatur von spontanen DNA-Schäden, Genom-umordnung und Genamplifikation während der verschiedenen Zellzyklusphasen, werden diskutiert und Vorschläge zur genaueren Bestimmung der biologischen Mechanismen erstellt.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß beim Trypsinieren von Monolayer



Zellen ein erheblicher Anteil der Zellen lysiert und permeabilisiert wird. Da zusätzlich die Instabilität der DNA durch DNA-transfer Experimente nachgewiesen wurde, könnte dieser DNA-transfer durch permeabilisierte Zellen erleichtert werden. Die Konsequenzen für die Stabilität und die Teilungsraten von Zelllinien werden diskutiert.

Das Konzept der spezifischen Aktivität besagt, daß bei chronischer Exposition, nach Erreichen des steady states, die spezifische Aktivität (i.e. das Verhältnis  $H-3/H-1$ , bzw.  $C-14/C-12$ ) aller nichtaustauschbarer H- bzw. C - Atome der Moleküle, in die H-3 oder C-14 eingebaut werden kann, gleich der spezifischen Aktivität der anorganischen und organischen Vorstufen ist.

Bei Geweben der Maus (Muskel, Pancreas, Milz) und bei Zellkulturen wurde nach Markierung der DNA mit HTO, D-[1-H-3]glucose und D-[U-C-14]glucose die Gültigkeit des Konzeptes der spezifischen Aktivität nachgewiesen, durch einen Vergleich der theoretisch berechneten und der experimentell bestimmten spezifischen Aktivität der DNA.

Nach Markierung mit HTO und HPLC Trennung der enzymatisch verdauten DNA, kann durch die Analyse der spezifischen Aktivität der isolierten Nukleoside, die theoretische Bestimmung der Markierungswege bestätigt werden.

Außerdem kann das Konzept der spezifischen Aktivität für die Bestimmung der Dosisfaktoren von H-3 und C-14, bei chronischer Belastung, benutzt werden. Dabei wird auch das organische Kompartiment von H-3 und C-14 berücksichtigt, was bei den existierenden Strahlenschutzvorschriften nicht der Fall ist.

## Summary

In the work presented:

- (i) the structural stability of cellular DNA and the existence of DNA-turnover has been studied in different eukaryotic systems,
- (ii) the concept of specific activity was studied by labeling DNA with H-3 and C-14 from inorganic and organic precursors and by comparing the theoretical specific activity values with the experimental values.

The structural stability of cellular DNA was investigated in different nondividing mouse tissues (muscle, pancreas) and confluent monolayer cells.

For confluent BHK 21 cells it was found that even after eight days after inoculation replicative DNA-synthesis did exist, that could not be totally inhibited by hydroxyurea.

Using cell cultures the existence and rate of DNA-turnover (i.e. cell cycle independent, continual degradation and resynthesis of parts of the cellular DNA) was studied using the following methods:

- by comparing the specific activity of DNA which has been labeled either during growth or during confluence,
- by separating the newly synthesized DNA-strand from the parental DNA in a CsCl gradient,
- by comparing the amount of incorporated H-3dThd on cell level, using autoradiography

The calculated extent of DNA-turnover depends on the method. After correction for DNA which is labeled by replicative DNA-synthesis, the rate of DNA-turnover was estimated to be 0.1 % per genom and h. The possible molecular causes of DNA-turnover as repair of spontaneous DNA-damage, DNA-rearrangement and geneamplification are discussed. Also proposals for the determination of the biological mechanisms of DNA-turnover are presented.

It is also shown, that a considerable fraction of cells were lysed and permeabilized by trypsinization. As instability of DNA was also demonstrated by DNA-transfer experiments, this DNA-transfer might be facilitated by permeabilization of cells. Consequences for the stability and analysis as function of number of cell divisions in established cell lines are discussed.

The concept of specific activity means that during chronic exposure, when steady state is reached, the specific activity (i.e. the ratio  $H-3/H-1$ , or  $C-14/C-12$ ) of all nonexchangeable H- or C - atoms that can be labeled by H-3 or C-14, is the same as the specific activity of the inorganic or organic source.

After labeling DNA from mouse tissues (muscle, pancreas, spleen) and of monolayer cells with H-3 or C-14 from HTO, D-[1-H-3]glucose and D-[U-C-14]glucose, the validity of the concept of specific activity was verified by comparing the theoretical calculated and the experimental obtained specific activity.

By enzymatic digestion of DNA, labeled with H-3 from HTO, and after separating the resulting nucleosides by HPLC, the theoretically calculated labeling pathways can be confirmed by the differences in the specific activity of the nucleosides.

The concept of specific activity can also be used for the calculation of dose factors for H-3 and C-14 during chronic exposure. By this the organic compartment for H-3 and C-14 is also considered which is not done in existing radiation protection recommendations.

## Abkürzungen

|                     |   |                                                                               |
|---------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------|
| Ap-site             | - | Apurinic site, oder Apyrimidinic site                                         |
| AraC                | - | Cytosin -1- $\beta$ -D-arabinofuranosid                                       |
| AUFS                | - | Absorbance Units Full Scale                                                   |
| BrdU                | - | 5-Bromo-2'-deoxyuridin                                                        |
| C-14                | - | Kohlenstoff 14                                                                |
| C-14 dThd           | - | [U-C-14] Thymidin                                                             |
| ddThd               | - | 2',3' - Dideoxythymidin                                                       |
| dNdP                | - | desoxyribonucleotiddiphosphat                                                 |
| EDTA                | - | Ethylenediaminetetraacetic Acid                                               |
| EGTA                | - | Ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic Acid     |
| G 6-PDH             | - | Glucose 6-PhosphatDehydrogenase                                               |
| H-3                 | - | Tritium                                                                       |
| H-3dThd             | - | [methyl-H-3] Thymidin                                                         |
| H-3BrdU             | - | 5-Bromo-2'-desoxy[1',2'-H-3] Uridin                                           |
| H-3Tdr              | - | H-3 markiertes Thymidin (alte Abkürzung)                                      |
| HEPES               | - | N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethylsulfonic acid                            |
| HPLC                | - | High Performance Liquid Chromatography                                        |
| HTO                 | - | Tritiiertes Wasser                                                            |
| HU                  | - | Hydroxyharnstoff                                                              |
| kb                  | - | Kilo base                                                                     |
| NMP                 | - | Nukleotidmonophosphat                                                         |
| NTP                 | - | Nukleotidtriphosphat                                                          |
| rNDP                | - | ribonukleotiddiphosphat                                                       |
| PIPES               | - | Piperazine-N,N'-bis[2-ethansulfonic acid]; 1,4-Piperazinediethansulfonic acid |
| SA                  | - | Spezifische Aktivität                                                         |
| SA <sub>Exp</sub>   | - | experimentell bestimmte spezifische Aktivität                                 |
| SA <sub>theor</sub> | - | theoretisch berechnete spezifische Aktivität                                  |
| SSC                 | - | Standard Saline Citrate Buffer                                                |
| tk                  | - | Thymidinkinase                                                                |
| T <sub>m</sub>      | - | Schmelzpunkt der DNA                                                          |



## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung                                                                       | 1  |
| 1.1. Stabilität der DNA                                                             | 1  |
| 1.1.1. Mechanismen die zu einer Veränderung der DNA führen                          | 2  |
| 1.1.1.1. Spontane DNA-Schäden                                                       | 2  |
| 1.1.1.2. Nachgewiesene permanente DNA-Veränderungen auf Gen-Ebene                   | 5  |
| 1.1.1.3. Rekombination der DNA                                                      | 7  |
| 1.1.2. Veränderung des zellulären DNA-Gehalts durch DNA-transfer (Gen-transfer)     | 9  |
| 1.1.3. Darstellung des DNA-turnovers in der Literatur                               | 14 |
| 1.1.4. Modelle zur Erklärung des DNA-turnovers                                      | 17 |
| 1.2. Anforderung an ein Zellsystem an dem DNA-turnover untersucht werden kann       | 18 |
| 1.2.1. Stationarität von Zellkulturen                                               | 18 |
| 1.2.2. Experimentelle Ergebnisse bei stationären Zellkulturen                       | 19 |
| 1.2.2.1. Untersuchung der DNA-Reparatur                                             | 19 |
| 1.2.2.2. Stimulierung der DNA-Synthese und der Zellteilung                          | 20 |
| 1.2.2.3. Untersuchung der DNA-Markierung als Funktion des Kulturalters              | 21 |
| 1.2.3. Immobilisierte Zellen als stationäres Zellsystem                             | 22 |
| 1.3. Einbau von H-3 und C-14 aus anorganischen und organischen Vorstufen in die DNA | 23 |
| 1.3.1. Theoretische Bestimmung der spezifischen Aktivität                           | 24 |
| 1.3.1.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Vorstufen                        | 24 |
| 1.3.1.2. Bestimmung der theoretischen spezifischen Aktivität der DNA                | 25 |
| 1.3.1.3. Metabolismus von HTO                                                       | 25 |
| 1.3.1.4. Metabolismus von D-[1-H-3]glucose                                          | 29 |
| 1.3.1.5. Metabolismus von D-[U-C-14]glucose                                         | 31 |
| 1.3.1.6. Metabolismus von L-[2,3-H-3]Aspartat                                       | 31 |
| 1.4. Experimentelle Ziele                                                           | 32 |
| 2. Material und Methoden                                                            | 33 |
| 2.1. Zellkultur                                                                     | 33 |
| 2.1.1. Zellen                                                                       | 33 |
| 2.1.2. Zellkultivierung                                                             | 33 |
| 2.1.3. Tiefgefrieren der Zellen                                                     | 34 |
| 2.1.4. Auftauen der Zellen                                                          | 34 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2. Tierhaltung                                                           | 34 |
| 2.3. DNA-Isolierung und Charakterisierung                                  | 35 |
| 2.3.1. Quantitative DNA-Isolierung nach Kasche et al. (1981B)              | 35 |
| 2.3.2. DNA-Extraktion (modifiziert nach Marmur (1961))                     | 36 |
| 2.3.3. Spektralphotometrische Bestimmung und Charakterisierung der DNA     | 36 |
| 2.3.4. Schmelzkurven                                                       | 37 |
| 2.3.5. Gelelektrophorese der DNA                                           | 37 |
| 2.3.6. Dichtegradientenzentrifugation                                      | 38 |
| 2.3.7. Flüssigkeitsszintillations-Messung                                  | 38 |
| 2.4. Enzymatische Verdauung der DNA und Trennung im HPLC                   | 39 |
| 2.4.1. Ausfällen der DNA                                                   | 39 |
| 2.4.2. Enzymatische Verdauung der DNA                                      | 40 |
| 2.4.3. Präparative Trennung der Nukleoside im HPLC                         | 40 |
| 2.5. Autoradiographie                                                      | 41 |
| 2.6. Nachweis der Schädigung der Zellen beim Ablösen                       | 42 |
| 2.6.1. Ablösen der Zellen mit verschiedenen proteolytischen Enzymen        | 42 |
| 2.6.2. Überleben der Zellen in den verschiedenen Enzymlösungen             | 42 |
| 2.6.3. Trypanblautest                                                      | 42 |
| 2.6.4. Bestimmung des Anteils lysierter Zellen                             | 43 |
| 2.6.4.1. Desoxy-H-3-glucose Freisetzung während der Zentrifugation         | 43 |
| 2.6.4.2. Bestimmung der G 6-PDH Aktivität                                  | 43 |
| 2.6.5. Kernisolierung                                                      | 44 |
| 2.6.5.1. Citrat Methode nach Higaschi et al. (1966)                        | 44 |
| 2.6.5.2. Percoll Methode modifiziert nach Nothacker und Hildebrandt (1984) | 44 |
| 2.7. DNA-Aufnahme und DNA-Austausch                                        | 45 |
| 2.7.1. DNA-Aufnahme                                                        | 45 |
| 2.7.2. DNA-Austausch                                                       | 45 |
| 2.8. Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA                         | 45 |
| 2.8.1. Bei Mäusen                                                          | 45 |
| 2.8.2. Bei Zellkulturen                                                    | 46 |
| 2.9. Bestimmung des DNA-turnovers bei tierischen Zellen                    | 46 |
| 2.9.1. Einsatz von Hemmstoffen bei der Bestimmung des DNA-turnovers        | 48 |
| 2.9.2. Inkubation von BHK 21 Zellen mit H-3BrdU                            | 50 |
| 2.9.3. Immobilisierung von BHK 21 Zellen                                   | 50 |
| 2.9.4. Inkubation der immobilisierten Zellen mit H-3BrdU und BrdU          | 51 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. Ergebnisse                                                                                                                          | 52 |
| 3.1. Methodische Ergebnisse                                                                                                            | 52 |
| 3.1.1. Vergleich der beiden DNA-Isolierungsmethoden                                                                                    | 52 |
| 3.2. Schädigung von Monolayer Zellen während des Ablösens                                                                              | 55 |
| 3.2.1. Variation des ermittelten DNA-Gehalts pro Zelle bei Verwendung von verschiedenen proteolytischen Enzymen zum Ablösen der Zellen | 55 |
| 3.2.2. Inkubation von BHK 21 Zellen in der Enzymlyse                                                                                   | 57 |
| 3.2.3. Bestimmung des Anteils an geschädigten Zellen                                                                                   | 60 |
| 3.2.3.1. G 6-PDH Aktivität in den Überständen                                                                                          | 61 |
| 3.2.3.2. Bestimmung der Desoxy-H-3-glucose Aktivität in den Überständen                                                                | 62 |
| 3.2.4. Bestimmung des DNA-Gehalts pro Zelle                                                                                            | 63 |
| 3.3. DNA-Aufnahme und DNA-Austausch bei BHK 21 Zellen                                                                                  | 64 |
| 3.3.1. DNA-Aufnahme aus dem Medium                                                                                                     | 65 |
| 3.3.2. DNA-Austausch zwischen Zellen                                                                                                   | 67 |
| 3.4. Spezifische Aktivität der DNA                                                                                                     | 70 |
| 3.4.1. Nuklidgehalt im Blutplasma der Mäuse                                                                                            | 70 |
| 3.4.2. Kinetik des Einbaus der Markierung in die DNA und Ausbau aus der DNA                                                            | 71 |
| 3.4.2.1. Kinetik des Einbaus der Markierung in die DNA bei Zellkulturen                                                                | 71 |
| 3.4.2.2. Kinetik des Einbaus der Markierung in die DNA und Ausbau aus der DNA bei verschiedenen Geweben der Maus                       | 72 |
| 3.4.3. Spezifische Aktivität während des Steady states                                                                                 | 72 |
| 3.4.4. Nachweis des Einbaus auf Nukleosid-Ebene                                                                                        | 75 |
| 3.4.4.1. Trennung der Nukleoside durch HPLC                                                                                            | 75 |
| 3.4.4.2. Spezifische Aktivität der Nukleoside                                                                                          | 77 |
| 3.5. Bestimmung des DNA-turnovers                                                                                                      | 78 |
| 3.5.1. DNA-turnover an nicht teilenden Geweben der Maus                                                                                | 78 |
| 3.5.2. Bestimmung des DNA-turnovers an konfluenten Zellkulturen                                                                        | 79 |
| 3.5.2.1. Das Untersuchungssystem                                                                                                       | 80 |
| 3.5.2.2. Bestimmung des Einbaus von H-3dThd in die DNA bzw. des Ausbaus von H-3 aus der DNA                                            | 82 |
| 3.5.2.2.1. Bei BHK 21 Zellen                                                                                                           | 82 |
| 3.5.2.2.2. Bei CHO Zellen                                                                                                              | 84 |
| 3.5.2.2.3. Bei MRC-5 Zellen                                                                                                            | 85 |
| 3.5.2.2.4. Zusammenfassung                                                                                                             | 86 |
| 3.5.2.3. Gleichzeitige Beobachtung des Ausbaus und des Einbaus                                                                         | 87 |
| 3.5.2.3.1. Bei BHK 21 Zellen                                                                                                           | 87 |

|                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5.2.3.2. Bei MRC-5 Zellen                                                                    | 88  |
| 3.5.2.3.3. Zusammenfassung                                                                     | 90  |
| 3.5.2.4. Einfluß des Mediumwechsels auf den beobachteten DNA-turnover bei BHK 21 Zellen        | 91  |
| 3.5.2.4.1. Einbau von H-3dThd bei täglichem Mediumwechsel                                      | 91  |
| 3.5.2.4.2. Einbau während des exponentiellen Wachstums und Ausbau, bei täglichem Mediumwechsel | 93  |
| 3.5.2.4.3. Einbau ohne Mediumwechsel                                                           | 94  |
| 3.5.2.4.4. Einbau über 24 h, Beobachtung des Ausbaus                                           | 95  |
| 3.5.2.4.5. Zusammenfassung                                                                     | 97  |
| 3.5.2.5. Einbaukinetik in die DNA mit einer anderen markierten Vorstufe (D-[1-H-3]glucose)     | 97  |
| 3.5.2.6. Einfluß von Hemmstoffen auf den beobachteten DNA-turnover                             | 99  |
| 3.5.2.6.1. Einfluß von Hydroxyharnstoff auf den Einbau bzw. Ausbau                             | 99  |
| 3.5.2.6.2. Einfluß anderer Hemmstoffe                                                          | 101 |
| 3.5.2.7. Abschätzung des Umfangs des beobachteten DNA-turnovers                                | 102 |
| 3.5.2.8. Zusammenfassung                                                                       | 102 |
| 3.5.3. Bestimmung des DNA-turnovers durch Dichtegradientenzentrifugation                       | 103 |
| 3.5.3.1. H-3BrdU Einbau mit Mediumwechsel                                                      | 104 |
| 3.5.3.2. H-3BrdU Einbau ohne Mediumwechsel                                                     | 106 |
| 3.5.3.3. Abschätzung des Anteils der durch DNA-turnover markierten DNA                         | 106 |
| 3.5.4. Nachweis des DNA-turnovers bei BHK 21 Zelle durch Autoradiographie                      | 108 |
| 3.5.4.1. Einbau mit Mediumwechsel                                                              | 109 |
| 3.5.4.2. Einbau ohne Mediumwechsel                                                             | 109 |
| 3.5.4.3. Abschätzung des Anteils der durch DNA-turnover markierten DNA                         | 112 |
| 3.5.5. Zusammenfassung                                                                         | 114 |
| 3.6. Immobilisierte Zellen als stationäres System                                              | 114 |
| 3.6.1. Zusammenfassung                                                                         | 117 |

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4. Diskussion                                                                   | 118 |
| 4.1 Zellschädigung durch Trypsin und andere proteolytischen Enzyme              | 118 |
| 4.1.1. Intrazelluläre Wirkung                                                   | 119 |
| 4.1.2. Zellveränderung nach Behandlung mit proteolytischen Enzymen              | 120 |
| 4.2. Aufnahme und Integration exogener DNA                                      | 122 |
| 4.2.1. Aufnahme und Integration exogen applizierter DNA                         | 122 |
| 4.2.2. DNA-Austausch zwischen Zellen                                            | 123 |
| 4.3. Konsequenzen                                                               | 124 |
| 4.4. Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA                              | 125 |
| 4.4.1. Nuklidgehalt im Blutplasma der Mäuse                                     | 125 |
| 4.4.2. Kinetik des Einbaus                                                      | 125 |
| 4.4.3. Spezifische Aktivität der DNA bei Markierung mit verschiedenen Vorstufen | 126 |
| 4.4.4. Aminosäuremetabolismus                                                   | 127 |
| 4.4.5. Untersuchung des Einbaus auf Nukleosidebene                              | 129 |
| 4.4.6. Berechnung der Dosis über das Konzept der spezifischen Aktivität         | 131 |
| 4.5. Bestimmung des DNA-turnovers in verschiedenen Systemen                     | 134 |
| 4.5.1. Bei verschiedenen Geweben der Maus                                       | 134 |
| 4.5.2. Bei konfluenten Monolayer Zellen                                         | 137 |
| 4.5.2.1. Analyse der spezifischen Aktivität                                     | 138 |
| 4.5.2.2. CsCl-Gradientenzentrifugation                                          | 138 |
| 4.5.2.3. Autoradiographie                                                       | 140 |
| 4.5.3. Einfluß des Mediumwechsels                                               | 142 |
| 4.5.4. Hemmstoffe                                                               | 144 |
| 4.5.5. Nukleotidpool                                                            | 147 |
| 4.5.6. Immobilisierte Zellen                                                    | 149 |
| 4.5.7. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse                                        | 150 |
| 4.5.8. Geschwindigkeit des DNA-turnovers                                        | 151 |
| 4.5.8.1. Spezifische Aktivität                                                  | 152 |
| 4.5.8.2. CsCl-Gradientenzentrifugation                                          | 154 |
| 4.5.8.3. Autoradiographie                                                       | 154 |
| 4.5.9. Biologische Mechanismen des DNA-turnovers                                | 155 |
| 4.5.9.1. Reparierbare DNA-Veränderungen                                         | 157 |
| 4.5.9.2. Permanente DNA-Veränderungen                                           | 158 |
| 4.5.9.3. Ausblick                                                               | 159 |
| 5. Literatur                                                                    | 161 |



## 1. Einleitung

Die DNA ist eines der bedeutendsten biologischen Moleküle. In der Sequenz der einzelnen Bauelemente (Nukleotide) ist die gesamte genetische Information für die Struktur und Funktion der zellulären Proteine und für die Kontrolle der Genaktivität kodiert.

Nicht nur Wachstum und Teilung werden durch die kodierte Information reguliert, sondern auch die Mechanismen, die ablaufen, wenn sich eine befruchtete Eizelle zu der Vielzahl spezialisierter Zellen, aus denen ein vielzelliger Organismus besteht, entwickelt.

Während das kurzfristige Überleben einer Spezies von der Konstanz der genetischen Information abhängt, die durch die hohe Genauigkeit der DNA-Replikation und die Reparatur von spontanen DNA-Schäden gewährleistet wird, kann das langfristige Überleben einer Spezies im Verlauf der Evolution durch genetische Veränderungen ermöglicht werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die Stabilität der DNA hinsichtlich ihrer strukturellen bzw. genetischen Integrität untersucht werden, und mögliche Ursachen, die zu einer Veränderung dieser Parameter führen, analysiert werden.

### 1.1. Stabilität der DNA

Da sich die Aminosäuresequenz einzelner Proteine im Verlauf der Evolution nur geringfügig verändert hat, muß auch die DNA-Sequenz über diesen Zeitraum unverändert geblieben sein. Deshalb wurde die zelluläre DNA, als Träger der genetischen Information lange als stabiles Molekül betrachtet. Cleaver (1967) schreibt:

"The unique stability of DNA molecules consequently gives a molecular basis for the stability of genetic information in a cell through successive cycles of growth and cell division and protracted periods of differentiation. ... Consequently, once DNA has been labelled with H-3Tdr or some other precursor, the only way in which label could be lost is by cell death followed by degradation of the labelled DNA."

In lebenden Zellen ist die DNA aber ständig Veränderungen unterworfen, die durch Strahlung oder Chemikalien induziert werden, oder spontaner Natur sein können, und die durch DNA-Reparatur-

mechanismen behoben werden (Cleaver 1978, Hanawalt et al. 1979, Grossman 1981, Lehman und Karran 1981, Lindahl 1982). Die Bedeutung der DNA-Reparatur, die auch als 'unscheduled DNA-synthesis' 'repair-replication' oder 'nicht semikonservative DNA-Synthese' bezeichnet wird, ist unter anderem erkennbar an:

- (i) dem Phänomen, daß nicht reparierte DNA-Schäden sowohl mutagener, als auch cancerogener Natur sein können,
- (ii) der Vielzahl und der Spezifität der an der Reparatur beteiligten Enzyme, und
- (iii) der Ähnlichkeit der verschiedenen Reparaturmechanismen in pro- und eukaryontischen Zellen.

Somit kann die Integrität der genetischen Information nicht nur durch eine hohe Stabilität des DNA-Moleküls, sondern auch durch sehr effektive und präzise DNA-Reparaturmechanismen erreicht werden.

#### 1.1.1. Mechanismen, die zu einer Veränderung der DNA führen

Während die Reparatur von exogen induzierten DNA-Schäden im allgemeinen akzeptiert ist, wird die Existenz von DNA-Veränderungen in ungeschädigten Zellen kontrovers diskutiert. Im Folgendem werden die Phänomene besprochen, die zu DNA-Veränderungen in ungeschädigten Zellen führen können.

##### 1.1.1.1. Spontane DNA-Schäden

Die Existenz der verschiedenen Reparaturmechanismen und Enzyme, sowie ihr frühes Auftreten im Verlauf der Evolution zeigen, daß spontane und durch Chemikalien oder Strahlung induzierte DNA-Veränderungen relativ häufig auftreten können. Um die genetische Integrität der DNA zu gewährleisten, müssen diese Veränderungen von der Zelle korrekt behoben werden. Die bei eukaryontischen Zellen bekannten endogenen DNA-Schäden sind in Tab. 1.1. aufgelistet und soweit möglich, wurde die Häufigkeit des Auftretens von einzelnen

| Art der Veränderung                                                                                                                  | Effekt                                                       | Häufigkeit im Genom<br>im Genom einer Säuger-<br>zelle unter physiolo-<br>gischen Bedingungen<br>[pro h] | Referenz                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Desaminierung                                                                                                                        | Cytosin → Uracil<br>Adenin → Hypoxanthin<br>Guanin → Xanthin | 5<br>0.05<br>?                                                                                           | Lindhahl und Nyberg 1974<br>Lindhahl und Nyberg 1974    |
| Hydrolyse der glyco-<br>sidischen Bindung                                                                                            | Depurinierung<br>Depyrimidierung<br>(AP-sites)               | 2000<br>100                                                                                              | Lindhahl und Nyberg 1972<br>Lindhahl und Kahlström 1973 |
| Hydrolyse der Phos-<br>phodiesterbindung                                                                                             | Einzelstrangbrüche<br>Doppelstrangbrüche                     | ?<br>?                                                                                                   | Kornberg 1980<br>Kornberg 1980                          |
| Während der DNA-Repli-<br>kation falsch einge-<br>baute Basen, die nicht<br>über den Proofreading-<br>mechanismus entfernt<br>werden |                                                              | ?                                                                                                        | Hanawalt et al. 1979                                    |
| Nicht enzymatische<br>Methylierung der DNA                                                                                           | N-3-methyladenin<br>N-3-methylguanin<br>O-6-methylguanin     | 2000                                                                                                     | Lindhahl 1982<br>Dempel und Karran 1983                 |

Tab. 1.1. Experimentell bestimmte endogene DNA-Veränderungen und die geschätzte Häufigkeit ihres Auftretens im Genom einer Säugerzelle unter physiologischen Bedingungen.

DNA-Schäden für das Säuger-genom berechnet.

Die Geschwindigkeitskonstante der hydrolytischen Desaminierung von Cytosinbasen in die einzelsträngige DNA ist bei 65° C  $k = 5 \cdot 10^{-10} \text{ sec}^{-1}$ , während die Geschwindigkeitskonstante der Desaminierung von Adenin geringer ist (Lindahl und Nyberg 1974). Unter physiologischen Bedingungen erfolgen im Genom einer Säugerzelle die spontane Desaminierung von ca. 5 Cytosinbasen und 0.05 Adeninbasen pro Stunde.

Die Reparatur der so veränderten Basen erfolgt durch DNA-Glycosylasen, welche die glycosidische Bindung zwischen der modifizierten Base und der Desoxyribose aufbrechen. Dabei entsteht eine sogenannte AP-site (apurinic oder apyrimidinic site). DNA-Glycosylasen sind sehr spezifisch für die veränderte Base. Bei Prokaryonten sind 15 verschiedene DNA-Glycosylasen bekannt, von denen einige auch in Eukaryonten nachgewiesen sind (Grossman 1981). Einige DNA-Glycosylasen weisen zusätzlich Nuklease Aktivität auf und können die Phosphodiesterbindung bei der veränderten Base aufspalten (Lindahl 1982) und damit die DNA-Reparatur durch Excision mit Exonucleasen, Gap-Filling und Ligation einleiten.

Ap sites (apurinic- oder apyrimidinic-sites) können entweder durch die beschriebenen Glycosylasen entstehen, oder durch die spontane Hydrolyse der glycosydischen Bindung (Yajko und Weiss 1975; Lindahl 1979). Für die spontane Depurinierung der DNA wurde bei 39° C eine Geschwindigkeitskonstante von  $k = 3 \cdot 10^{-11} \text{ sec}^{-1}$  beobachtet (Lindahl und Nyberg 1972); das entspricht unter physiologischen Bedingungen einem Verlust von ca. 2 000 Purinbasen pro Stunde im Genom einer Säugerzelle. Die Depyrimidierung der DNA findet mit einer 20-fach geringeren Geschwindigkeit statt (Lindahl und Kahlström 1973).

Die Reparatur der AP-sites erfolgt durch AP-endonukleasen, welche die DNA entweder am 3' Ende der AP-site (Klasse I), oder am 5' Ende (Klasse II) schneiden (Grossman und Graftström 1982). Bei menschlichen Fibroblasten sind Insertasen beschrieben, die eine Purinbase direkt in die Apurinic Site einsetzen können (Deutsch und Linn 1979).

Durch spontane Hydrolyse der Phosphodiesterbindung können Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche auftreten. Es kann vermutet werden, daß bei der Entwindung beider DNA-Stränge, vor und während der DNA-

bzw. RNA-Polymeraseaktivität zusätzliche Strangbrüche entstehen, da z.B. durch Hemmung der Transkription bei E.coli (Grivell et al. 1975) und bei unstimulierten Lymphozyten (Akijeff und Aingorn 1972) der Einbau von H-3dThd in die DNA deutlich reduziert werden kann. Eine nicht enzymatische Alkylierung der DNA kann durch die Reaktion der DNA mit S-adenosinmethionin stattfinden (Lindhahl 1982) und die modifizierten Basen: N-3 methyladenin und N-3 methylguanin werden als freie Purinbasen durch Glycosilasen von der DNA entfernt. Im Gegensatz dazu wird O<sup>6</sup>-methylguanin in einem einzigen Schritt durch ein sogenanntes 'suicide' Enzym entfernt (Lindhahl et al. 1982, Demple und Karan 1983).

Neben den beschriebenen endogenen DNA-Veränderungen ist die DNA in vivo einer Vielzahl von chemischen und physikalischen Agentien, sowie freien Radikalen, die während des Metabolismus entstehen können, ausgesetzt. Auch diese Agentien führen zu DNA-Schäden. Die Bedeutung der durch diese Agentien hervorgerufenen DNA-Schäden ist z.B. erkennbar an den Symptomen von menschlichen Erbkrankheiten, bei denen die durch UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden nicht repariert werden. So findet bei den menschlichen Krankheiten Xeroderma Pigmentosum und Bloom's Syndrom keine Exzisionsreparatur von UV-Schäden statt (Cleaver 1971, Kornberg 1980).

#### 1.1.1.2. Nachgewiesene permanente DNA-Veränderungen auf Gen-Ebene

Neben den spontanen DNA-Schäden, die unabhängig vom Zellzyklus sind, und die auch während der G<sub>1</sub> bzw. G<sub>0</sub> Phase auftreten, sind mit gentechnologischen Methoden permanente DNA-Veränderungen nachgewiesen worden. Diese permanenten DNA-Veränderungen, die innerhalb eines oder weniger Zellzyklen ablaufen, stehen in Widerspruch zu der postulierten Stabilität der DNA (Kap. 1.1.) und zeigen, daß die DNA in vivo kein starres, unveränderbares Molekül ist. Folgende permanente DNA-Veränderungen wurden auf Gen-Ebene nachgewiesen:

- (i) DNA mediated Gen Transfer Die Instabilität der DNA wird z.B. direkt ausgenutzt für den stabilen Einbau fremder Gene in das Ge-

nom einer Rezipienten-Zelle (Wigler et al. 1977, Klobutcher et al. 1980) oder in die Keimbahnzellen von Mäusen (Schnieke et al. 1983, Brinster et al. 1983). Dabei können klonierte Gene über verschiedene Mechanismen ( $\text{CaP}_1$ -Präzipitation, Lipidpartikel, in Chromosomen verpackt, oder durch Mikroinjektion) in die Rezipienten-Zellen transloziert werden, und die Expression der Gene kann nachgewiesen werden. Die Erfolgsrate für eine stabile Integration und Expression des transferierten Gens liegt zwischen  $10^{-5}$  und  $5 \cdot 10^{-2}$ , und hängt stark von der verwendeten Transfermethode und auch von der Art der Rezipientenzellen ab (Kap. 1.1.2.).

- (ii) Gen-Amplifikation (DNA-Amplifikation) Genamplifikation ist ein relativ häufiges Ereignis, das zu einer stabilen Veränderung der Eukaryonten DNA führt, und das durch einen erhöhten Bedarf an spezifischen Genprodukten induziert werden kann (Stark und Wahl 1984). Genamplifikation ist im Zusammenhang mit der Methotrexate Resistenz durch Amplifizierung des Dehydrofolat Reduktase Gens am intensivsten untersucht (Schimke 1982), kann aber auch spontan mit bis zu  $3 \cdot 10^{-2}$  Amplifikationen pro Generation auftreten (Johnston et al. 1983). Ein erhöhter Bedarf an essentiellen Enzymaktivitäten, der durch Genamplifikation kompensiert wird, kann entweder während definierter Entwicklungsphasen auftreten (Spradling und Mahowald 1981, Glover et al. 1982) oder durch Enzyminhibitoren induziert werden (Wahl et al. 1979). Die Genamplifikation ist unabhängig von der Zellteilung und findet innerhalb eines Zellzyklus statt (Roberts et al. 1983), und der amplifizierte DNA-Bereich kann stabil in das zelluläre Genom integriert sein (Nunberg et al. 1978). Die Größe der amplifizierten DNA-Region liegt zwischen 10 - 2000 kb (Wahl et al. 1984) und ist damit länger als das strukturelle Gen selbst, so daß angenommen werden kann, daß zusätzlich flankierende Kontrollsequenzen des Gens mitamplifiziert werden. Auf Grund der Größe des amplifizierten Bereiches ist der Begriff DNA-Amplifikation dem Begriff Gen-Amplifikation vorzuziehen.

(iii) Transponierbare Elemente Transponierbare Elemente, die eine chromosomale Umordnung induzieren können, sind bei E.coli und Eukaryonten (Hefe, Mais und Drosophila) beschrieben (Shapiro 1982). Die Häufigkeit der chromosomalen Umordnung des 'foldback elements' bei Drosophila ist etwa  $10^{-3}$  pro Genom (Collins und Rubin 1984) und es gibt starke Hinweise, daß auch in menschlichen Zellen transponierbare Elemente auftreten (Potter 1984).

(iv) 'Promiscuous DNA' Der natürliche Transfer von mitochondrialen DNA-Sequenzen in das nukleare Genom wurde bei Hefe, und der Transfer zwischen chloroplasten- und nuklearem Genom, bzw. zwischen mitochondrialem- und nuklearem Genom wurde bei verschiedenen Pflanzen (Spinat, Mais und Erbsen) beobachtet (Stern und Palmer 1984). Dabei ist der Mechanismus des Transfers noch unbekannt.

Die in Säugerzellen existierenden Sequenzhomologien zwischen einigen Pseudogenen und den 'Alu-like' Elementen (kurze 300 bp lange DNA-Sequenzen, die durch Schneiden mit dem Restriktionsenzyme Alu I entstehen), sowie die Homologie einiger 'Alu-like' Elemente mit der cytoplasmatischen 7 S, und 4.5 S-RNA führen zu einem Modell, bei dem der Einbau von DNA-Kopien des RNA-transkripts in die nukleare DNA postuliert wird (Jagadeeswaran et al. 1981, Sharp 1983). Dieses Modell wird durch die Beobachtung unterstützt, daß ein anderes RNA-Molekül, die U3 sn RNA, in vitro ein 'self priming template' für die Reverse Transkriptase darstellt (Bernstein et al. 1983). Der Mechanismus dieses Transfers ist unbekannt, und auch über die Häufigkeit dieses Austausches ist nichts bekannt.

#### 1.1.1.3. Rekombination der DNA

Zusätzliche Hinweise auf eine nicht mutagene oder cancerogene Veränderung des DNA-Moleküls zeigt die während der Zellteilung und Zelldifferenzierung im Detail untersuchte Umordnung von ganzen DNA-Regionen.

- (i) Die somatische Rekombination von Immunoglobulin Genen während der Reifung der Lymphocyten. Die Vielfalt der Antikörper erklärt sich dadurch, daß während der Reifung der B-Lymphocyten, verschiedene, weitverstreute DNA-Segmente zu einem antikörperkodierenden DNA-Abschnitt rekombiniert werden. Die schwere Kette der Immunoglobuline setzt sich z.B. aus vier verschiedenen DNA-Segmenten zusammen:  $V_H$  (variabel region), D (diversity),  $J_H$  (joining) und  $C_H$  (constant). Von den 100 - 200 verschiedenen  $V_H$ -Segmenten, den 12 D-Segmenten und den 4  $J_H$ -Segmenten, die im haploiden Genom in der Keimbahn vorhanden sind, ist in einer Antikörper synthetisierenden Zelle jeweils ein  $V_H$ -Segment, ein D-Segment und ein  $J_H$ -Segment 'tail to head' zusammengesetzt. Dieses DNA-Stück bildet die komplette  $V_H$ -Region des Antikörpers und kann über 'Schalter' zu den Genorten der 8 verschiedenen konstanten Regionen springen (Tonegawa 1983).
- (ii) Genetische Rekombination. Bei der Paarung homologer Chromosomen können DNA-Stränge ausgetauscht werden und eine Neurekombination von Genen entstehen. Es existieren verschiedene Modelle, welche die einzelnen molekularen Schritte der genetischen Rekombination erklären (Howard-Flanders et al. 1983). Die grundlegenden Mechanismen sind bei Viren, Bakterien und eukaryontischen Zellen gleich (Alberts et al. 1983) und bei E. coli sind mindestens 10 Rekombinationsfunktionen durch Mutanten charakterisiert (Knippers 1982): Neben Exo- und Endonucleasen, DNA-Polymerase I, Helix destabilizing Protein, Single Strand binding Protein, das Rec BC Gen Produkt (eine ATP abhängige DNase) (Radding 1978) ist auch das Rec A Protein an der Rekombination beteiligt (Howard-Flanders et al. 1984). Einige dieser Enzyme sind auch an der 'SOS-Reparatur' der DNA (Lehmann und Karran 1981, Radding 1978), und das SSB-Protein an der DNA-Replikation beteiligt (Alberts et al. 1983).

Diese Beispiele zeigen, daß die zelluläre DNA in vivo Veränderungen unterworfen ist, deren Bedeutung unter anderem an der Existenz der spezifischen Reparaturenzymen erkannt werden kann.

Die zusätzlichen Veränderungen, sowie die beschriebene somatische und genetische Rekombination weisen auf die Existenz von Enzymsystemen, die in der Lage sind, die Umordnung von DNA-Segmenten korrekt

durchzuführen. Eine unkorrekt durchgeführte Rekombination kann, wie auch ein nicht reparierter Schaden der DNA, zu Mutationen oder Krebs führen. Zum Beispiel besteht ein direkter Zusammenhang zwischen speziellen somatischen Translokationen und einigen humanen Neoplasmen (z.B. Burkitt Lymphoma) (Leder et al. 1984).

### 1.1.2. Veränderung des zellulären DNA-Gehaltes durch DNA-transfer (Gen-transfer)

Die Konstanz und die Stabilität einer Zelllinie kann durch den Prozeß des DNA-transfers<sup>1)</sup> verändert werden. Viele Arbeiten weisen den Einbau exogener DNA in das Genom der Rezipienten-Zellen nach, und dieser Einbau wird vor allem als Gentransfer<sup>1)</sup>, auch bei Tieren, untersucht.

Da Serum, das dem Wachstumsmedium zugesetzt ist, DNA enthalten kann (Cox und Gokcen 1976) und DNA auch von einigen Zellen exkretiert wird (Anker et al. 1980), kann die Aufnahme exogener DNA und die mögliche Expression der aufgenommenen Gene zu einer permanenten Veränderung einer etablierten Zelllinie führen.

Während beim DNA-transfer die stabile Integration der exogenen DNA in das Genom der Rezipienten-Zelle untersucht wird, ist beim Gen-transfer sowohl die Integration der exogenen DNA, als auch die Expression der untersuchten Gene von Bedeutung. DNA-transfer, bzw. Gentransfer führen zu einer DNA-transformation<sup>2)</sup> der Rezipienten-Zelle, da der Genotyp der Zelle verändert wird.

Der Transfer exogener DNA in die Rezipienten-Zellen bis zur Expression der transferierten Gene kann in folgende Schritte aufgeteilt werden, die in Fig. 1.1. skizziert sind:

- (i) Penetration der Plasmamembran
- (ii) Transport zum Kern
- (iii) Einschleusen in den Kern
- (iv) Integration in das Genom der Rezipienten-Zelle
- (v) Expression der transferierten DNA (bzw. des Gens)

---

<sup>1)</sup> Die Begriffe DNA- bzw. Gentransfer bedeuten hier nicht Injektion von Genen in Eizellen und Oocyten von Amphibien zur Untersuchung der Expression (Gurdon und Melton 1981).

<sup>2)</sup> In der Literatur wird von transformierten Zellen gesprochen. Allerdings beschreibt derselbe Begriff 'transformiert' in der Zellkultur ein anderes Phänomen, die virale Transformation, oder eine andere maligne Transformation einer etablierten Zelllinie.

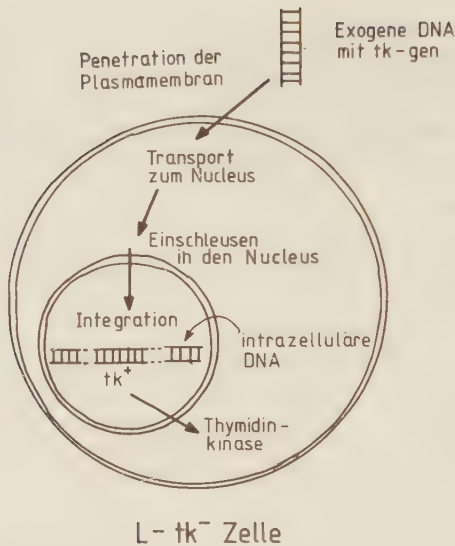


Fig. 1.1. Transfer exogener DNA in das Genom einer Rezipienten-Zelle. Die Rezipienten-Zelle ist defizient für das Enzym Thymidinkinase (tk) und kann nicht in HAT-Medium wachsen. Nach dem DNA-transfer mit tk-DNA, können die Zellen, die Thyminkinase synthetisieren durch Inkubation in HAT-Medium selektioniert werden.

Da die Zellmembran eine effektive Barriere für Nukleinsäuren ist, und im Serum, wie auch im Cytoplasma, DNasen vorhanden sind, kann die Effizienz des DNA-transfers/Gen-transfers erhöht werden, durch eine Unterstützung bei der Penetration der Plasmamembran und durch einen Schutz der DNA vor dem Abbau durch DNasen.

Dies wird durch folgende Methoden erreicht:

- (i) Verwendung von Chromosomen für den Transfer (Chromosome mediated gene transfer) (Klobutcher et al. 1980),
- (ii) Präzipitation der DNA mit Calciumphosphat ( $\text{CaP}_i$ ) (Graham und VanderErb 1973),
- (iii) Verpackung der DNA, oder der Chromosomen in
  - Microzellen (Fournier und Ruddell 1977)
  - Lipid Vesikel (Schaefer-Ridder et al. 1983),
  - Virus Partikel (Sliatly und Aposhian 1983),

(iv) Erleichterung des Transfers der DNA durch Elektrophorese (Ocho et al. 1981) oder durch elektrische Pulse (Neumann et al. 1982),

(v) Microinjektion der DNA in den Zellkern (Capecchi 1980).

Im Serum des Wachstumsmediums und im Cytoplasma der Zellen sind DNasen, die extranukleare DNA abbauen. Durch Kopräzipitation mit  $\text{CaP}_i$ , oder durch Verpackung in Vesikel wird die DNA vor dem Abbau durch DNasen teilweise geschützt und die Penetration der Plasmamembran erleichtert.

Der DNA- $\text{CaP}_i$  Komplex überwindet die Plasmamembran durch Phagozytose (Loyter et al. 1982B). Chromosomen sind durch ihren natürlichen Gehalt an RNA und Proteinen und durch ihre kompakte Gestalt vor dem Abbau durch DNase geschützt. Die Bedeutung des Abbaus durch DNasen und der Plasmamembran als Barriere für die exogene DNA, zeigt sich in der höheren Transfereffizienz (Faktor 100 - 1000) bei der direkten Microinjektion in den Zellkern.

Das Einschleusen der DNA in den Nukleus und die stabile Integration in das Genom scheinen ebenfalls zwei kritische Ereignisse darzustellen. Während fast alle Maus Zellen  $\text{CaP}_i$ -DNA Komplexe aufnehmen, ist nur bei 1 - 5 % der Zellen  $\text{CaP}_i$ -DNA auch im Kern nachweisbar (Loyter et al. 1982B). Direkt nach der Microinjektion des tk-gens in den Nukleus, zeigen 50 - 100 % der Zellen tk-Aktivität, während nur 0.1 - 0.5 % der Zellen stabil transformiert werden, und in der Lage sind in HAT-Medium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium) zu wachsen (Capecchi 1980).

Die Effizienz des DNA-transfers/Gen-transfers ist von verschiedenen Parametern abhängig:

- (i) pH Wert bei der Bildung des  $\text{CaP}_i$ -DNA Komplexes. Der pH Wert bei dem der DNA- $\text{CaP}_i$  Komplex gebildet wird ist sehr entscheidend für die Effizienz des Transfers. Nur DNA, die in einem pH Bereich von 6.9 - 7.4 ausgefällt wird, führt zu stabilen Transformationen (Graham und VanderErb 1973).
- (ii) der Zustand der DNA und das Molekulargewicht. Das Molekulargewicht der DNA hat nicht nur einen Einfluß auf die Effizienz des Gen-transfers, sondern auch des DNA-Transfers. Beim Gen-transfer ist die Bedeutung des Molekulargewichts auf die Trans-

fer-Effizienz offensichtlich, da nur intakte Gene mit intakten Kontrollregionen stabil inkorporiert und exprimiert werden können. Aber auch beim DNA-transfer ist die Effizienz höher, wenn hochmolekulare DNA eingesetzt wird (Laval et al. 1970, Snow und McLaren 1974).

- (iii) Konzentration der DNA Die Menge eingebauter DNA steigt linear mit der Konzentration der exogenen applizierten DNA und erreicht bei hohen Konzentrationen ein Plateau (Lewis et al. 1980). Für die Effizienz des Gentransfers ist aber nicht die Anzahl der applizierten Gene entscheidend, sondern die Menge der applizierten DNA, so daß bei Verwendung von 'carrier DNA' die Effektivität stark erhöht wird (Graham und VanderErb 1973).
- (iv) Zellen und Zellzyklusphase Die Effizienz der Transformation ist abhängig vom Zelltyp. Für den Gen-transfer werden vor allem Maus L tk<sup>-</sup> Zellen als Rezipienten-Zellen verwendet. Unter gleichen Bedingungen haben CHO- und Hela Zellen eine geringere Transformationsrate (Gorman et al. 1983). Die Effizienz des Gen-transfers ist von der Zellzyklusphase abhängig und ist in der S-Phase am höchsten (Giulotto und Israel 1984).
- (v) Bei DNA-transfer Experimenten wurde ein Unterschied in der Transfereffizienz zwischen homologer DNA (gleiche Spezies) und heterologer DNA (DNA verschiedener Spezies) beobachtet (Kao et al. 1973). Dabei wurde allerdings DNA verwendet, die nicht frei von RNA und Proteinen war, so daß andere Prozesse für den beobachteten Abbau verantwortlich gemacht werden können. Sowohl mit viraler DNA (Wigler et al. 1977), wie auch mit der gesamten zellulären DNA von Pro- und Eukaryonten als Donor, konnte Gen-Transfer nachgewiesen werden (Wigler et al. 1978, 1979A).

Zum Nachweis der Aufnahme und Integration der Donor DNA in das Genom der Rezipientenzelle wird beim DNA-transfer H-3BrdU markierte Donor DNA verwendet. Nach dem DNA-transfer kann durch CsCl-Zentrifugation die stabile Integration durch eine Dichteverschiebung der Rezipienten-DNA nachgewiesen werden (Ayad und Fox 1968, Hill

und Huppert 1970, Kao et al. 1973).

Zum Nachweis der Gen-transfers werden Mutanten mit zellulären oder viralen Genen, die für selektionierbare biochemische Marker kodieren, transformiert. Die Transformation wurde mit

- dem Thymidinkinase (tk) Gen (Bachetti und Graham 1977, Wigler et al. 1977, 1978),
- dem Chloramphenicol Transacylase (CAT) Gen (Gorman et al. 1983),
- dem Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase (HPRT) Gen (Mukherjee et al. 1978, Fournier und Ruddle 1977),

durch Selektion in HAT Medium nachgewiesen, und für das Dihydrofo-lat Reduktase (DHFR) Gen, das zu einer Resistenz gegen Methotrexat führt, durch Inkubation der Zellen mit erhöhten Methotrexate Konzentrationen (Cline et al. 1980, Wahl et al. 1984).

Diese selektionierbaren Gene können auch zum Kotransfer von nicht selektionierbaren Genen verwendet werden:

- mit mehreren zusammenhängenden Genen, die zum Beispiel auf einem Plasmid (Gorman et al. 1983), oder einem Chromosom (Miller und Ruddle 1978) liegen, und
- mit nicht zusammenhängenden Genen, z.B.  $\beta$  Globin Gen und tk Gen (Wold et al. 1979) oder pBR 322 DNA und tk Gen (Wigler et al. 1979A).

Die Integration der einzelnen Gene in das Genom ist unspezifisch und findet an verschiedenen Chromosomen statt, so daß eine Integration über homologe Rekombination ausgeschlossen werden kann (Pellicer et al. 1980).

Unter selektiven Bedingungen sind die transformierten Zellen über mehr als 100 Generation stabil, während unter nicht selektionierenden Bedingungen sowohl instabil als auch stabil transformierte Zellen beobachtet wurden (Wigler et al. 1977, Klobutcher et al. 1980).

Es ist nicht geklärt, in welchem Maße die für die Integration der exogenen DNA verantwortlichen Mechanismen umkehrbar sind und auch zu einem Ausbau der DNA führen können.

### 1.1.3. Darstellung des DNA-turnovers in der Literatur

Die Reparatur von spontanen und nicht exogen induzierten DNA-Schäden in nicht teilenden Zellen (Alberts et al. 1983), und die Umordnung von DNA-Segmenten innerhalb des Genoms von eukaryontischen Zellen sind allgemein akzeptiert und sollten in nicht teilenden Zellen als DNA-turnover beobachtet werden.

DNA-turnover kann definiert werden als die kontinuierliche Erneuerung von Teilen der zellulären DNA, die unabhängig von den einzelnen Zellzyklusphasen ist. Im Gegensatz zur DNA-Replikation während der S-Phase, bei der sich der DNA-Gehalt verdoppelt, erfolgt beim DNA-turnover keine oder eventuell nur eine geringe Zunahme des DNA-Gehalts einer Zelle.

Die strukturelle Stabilität der DNA und die Existenz eines DNA-turnovers bei ungeschädigten, nicht teilenden Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert:

Zum einen wird die Halbwertszeit der DNA mit 593 Tagen angegeben (Commerford et al. 1982B), und zum andern wurde ein Turnover der DNA beobachtet, bei dem 0.8 % der gesamten zellulären DNA pro Stunde erneuert werden (Stroun et al. 1967).

Die Literaturwerte für den beobachteten DNA-turnover bei nicht teilenden E.coli Zellen schwanken zwischen 0.04 % pro Genom und h, wobei jede erneuerte DNA-Sequenz ca. 30 Nukleotide lang ist (Grivell et al. 1975), und 0.3 % pro Genom und h, wobei die erneuerte DNA-Sequenz ca. 160 Nukleotide lang ist (Tang et al. 1979).

Bei Pflanzen ist ein DNA-turnover in den Wurzelzellen von Erbsenkeimlingen beobachtet worden (Bryant et al. 1974). Ebenso wird bei differenzierenden Wurzelzellen der Bohne die Existenz einer metabolen DNA beschrieben (Sampson und Davies 1967, MacLeod 1973), die auf Gen-Amplifikation zurückgeführt wird.

Bei tierischen Geweben , bzw. Zellkulturen von tierischen Zellen ist

die Stabilität der DNA intensiver untersucht und die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse sind bei Cleaver (1967, 1974), Adrian (1972) und Pelc (1972) zusammengefaßt.

Nach Markierung der DNA mit H-3dThd konnte durch die Analyse der isolierten DNA und/oder autoradiographische Auswertung eine Instabilität der DNA beobachtet werden.

Bei erwachsenen Mäusen konnte sowohl eine Markierung der DNA in den nicht teilenden Geweben wie Pankreas und Muskel beobachtet werden (Messier und Leblond 1960, Kasche et al. 1978, Stroun et al. 1967), als auch ein Ausbau der Markierung aus der DNA von Pankreaszellen (Kasche et al. 1978) und von Muskelzellen mit einer Rate von 0.8 % pro h (Stroun et al. 1967). Bei Ratten konnte ebenfalls ein Einbau von H-3dThd in die DNA, bzw. ein Ausbau von H-3 aus der DNA von verschiedenen, nicht teilenden Geweben beobachtet werden (Gerber et al. 1960)

Durch zusätzlichen Kältestreß wurde ein stärkerer Umsatz der DNA von Zellen des Nebennierenrindenmarks beobachtet; dabei waren ca. 7.8 % der Zellen schwach markiert. Die biologische Halbwertszeit der DNA wurde bei den kälte-exponierten Tieren mit 10 Tagen und bei den Kontrolltieren mit 32 Tagen angegeben (Pelc und Viola Magni 1969). In Gehirnzellen von erwachsenen Mäusen und Ratten konnte ein Einbau von H-3dThd in die DNA von Glia-Zellen und Neuronen beobachtet werden (Cameron et al. 1979, Reinis 1975, Gerber und Maes 1981). Mit biochemischen Methoden wurde ein Umsatz der DNA dieser nicht-teilenden Zellen nachgewiesen (Winzerith et al. 1977, Kimberlin et al. 1974).

Die ermittelten Werte für die Halbwertszeit der DNA, und den Anteil der am DNA-turnover beteiligten DNA sind in Tabelle 1.2 zusammengestellt.

Bei Kulturen von nicht teilenden Zellen werden unterschiedliche Ergebnisse über die Stabilität der DNA berichtet. Mit autoradiographischen Methoden (1 Woche Expositionszeit) konnte bei Makrophagen des Kaninchens kein DNA-turnover beobachtet werden (Watts und Harris 1959), während bei konfluenten CHO Zellen mit nicht biochemischen Methoden ein DNA-turnover von ca. 0.4 % pro h nachgewiesen wird (Hahn et al. 1968).

| Gewebe | Halbwertszeit<br>[d] | Anteil der beteiligten<br>DNA<br>[%] | Tier  | Referenz             |
|--------|----------------------|--------------------------------------|-------|----------------------|
| Milz   | 4.0                  | 40                                   | Ratte | Gerber et al. 1960   |
|        | 3.4                  | 79                                   | Maus  | Gerber und Maes 1981 |
| Muskel | 26.0                 | -                                    | Ratte | Gerber et al. 1960   |
|        | -                    | 40                                   | Maus  | Stroun et al. 1967   |
| Gehirn | 10.0                 | 70                                   | Maus  | Kimberlin et al. 197 |
|        | 15.0                 | 64                                   | Maus  | Gerber und Maes 1981 |
| Leber  | 9.8                  | 65                                   | Maus  | Gerber und Maes 1981 |

Tab. 1.2. Durch DNA-turnover bedingter Ausbau von radioaktiv markierten Nukleotiden aus der DNA von verschiedenen, nicht teilenden Geweben von Maus und Ratte.

Die experimentelle Beobachtung des DNA-turnovers hängt von der verwendeten Untersuchungsmethode ab. Bei autoradiographischer Analyse wird die Existenz von leicht markierten Zellen nur bei langen Expositionszeiten beobachtet (> 39 Tagen, Pelc und Viola Magni 1969), während bei kurzer Expositionszeit (7 Tagen, Watts und Harris 1959) oder einer Pulsmarkierung von 15 min (Hahn et al. 1968) keine Markierung der nicht teilenden Zellen beobachtet wird.

Durch CsCl Gradientenzentrifugation der DNA von Säugerzellen kann kein DNA-turnover beobachtet werden (Gautschi et al. 1972). Allerdings wurden dabei keine stationären Zellen verwendet, so daß die beobachtete Verunreinigung der parentalen DNA durch die wesentlich stärker markierte Tochter-DNA noch nicht gegen die Existenz von DNA-turnover spricht.

Durch Analyse der mit H-3dThd markierten, isolierten DNA wird sowohl bei nicht teilenden Geweben der Maus, als auch bei konfluenten stationären Zellkulturen ein hoher Turnover der DNA (0.5 - 1.6 % pro Genom und h) beobachtet (Kimberlin et al. 1974, Stroun et al. 1967). Mit dieser Technik kann jedoch nicht unterschieden werden, zwischen Zellen, deren DNA während der S-Phase markiert wurde, und Zellen, deren DNA durch DNA-turnover markiert wurde.

Die in der Literatur widersprüchlich diskutierten Ergebnisse erlauben keine eindeutige Aussage über die Existenz eines DNA-turnovers in nicht teilenden Zellen. Sie zeigen aber, daß alle Methoden bei der Untersuchung des DNA-turnovers eingesetzt werden müssen, und daß DNA-turnover nur an nicht teilenden, stationären Zellen untersucht werden sollte.

#### 1.1.4. Modelle zur Erklärung des DNA-turnovers

Es gibt verschiedene Modelle, die versuchen die Ursachen für die beobachtete Instabilität der DNA zu erklären:

- (i) In einem Modell von Pelc (1972) wird die instabile DNA als 'metabole DNA' bezeichnet, die im Gegensatz zur 'genetischen DNA' steht. Die Aufgabe der 'genetischen DNA' ist die in ihr kodierte genetische Information zu erhalten und an die Nachkommen weiterzugeben, während die 'metabole DNA' als 'working DNA' aktiv an der Transkription beteiligt ist. Es wird angenommen, daß die 'metabole DNA' aus zusätzlichen Genkopien besteht, die alle transkribiert werden.
- (ii) Ein weiteres Modell erklärt das Auftreten der 'metabolen DNA' und der reiterativen Sequenzen mit der sogenannten 'ticket Hypothese' (Guille und Quetier 1973). Die tickets sollen aus einem oder mehreren Nukleotiden bestehen, und bei der quantitativen Kontrolle der Genexpression, sowohl auf Transkriptions- wie auch auf Translationsebene beteiligt sein.

Da die Existenz von spontanen DNA-Schäden nachgewiesen ist, und auch gezeigt wurde, daß DNA-Schäden durch die Backgroundstrahlung induziert werden können (Kap. 1.1.1.1.) kann der DNA-turnover auch durch die kontinuierliche Reparatur dieser Schäden erklärt werden. Durch die Bestimmung der Rate des DNA-turnovers kann die Häufigkeit dieser DNA-Schäden berechnet werden.

## 1.2. Anforderung an ein Zellsystem an dem DNA-turnover untersucht werden kann

Zur Bestimmung des DNA-turnovers sollten stationäre, nicht teilende Zellen verwendet werden. Bei Organismen sollten die verschiedenen nicht teilende Gewebe ein geeignetes zelluläres System zur Untersuchung des DNA-turnovers darstellen. Für die Zellen des zentralen Nervensystems, Skelettmuskel und Pankreas wird ein sehr geringer Zellturnover (100 - 500 Tagen) berichtet (Cameron 1971). Daneben sollten auch Zellkulturen von nicht transformierten Säugerzellen ein geeignetes Untersuchungssystem darstellen, da:

- (i) für Zellkulturen ein geringerer materieller und zeitlicher Aufwand erforderlich ist,
- (ii) die Zellen unter definierten Bedingungen kultiviert werden können.

### 1.2.1. Stationarität von Zellkulturen

Nach dem exponentiellen Wachstum erreichen kultivierte, nicht transformierte Säugerzellen eine stationäre Phase, in der die Zellzahl konstant bleibt und die Zellen in einen ruhenden Zustand übergehen, in dem mehr als 95 % der Zellen einen DNA-Gehalt haben, der dem der  $G_1$ -Phase entspricht (Baserga 1978). Dieser stationäre, ruhende Zustand kann neben Wachstumsinhibition durch hohe Zellzahl auch durch einen Mangel an essentiellen Nährstoffen wie Serum, Isoleucin, Glutamin u. a. erreicht werden (Pardee 1974).

Die zellulären Mechanismen, die zu diesem stationären Zustand führen, sind unbekannt und ebenso ist ungeklärt, ob die Zellen in einem einheitlichen physiologischen Zustand sind, der sich von den Phasen des Zellzyklus ( $G_1$ , S,  $G_2$ , M) unterscheidet. Allerdings ist das Zeitintervall zwischen der Stimulierung von stationären Zellen bis zum Beginn der S-Phase oft länger als das Intervall zwischen Mitose und S-Phase, so daß ein qualitativ anderer Zustand postuliert werden kann.

Es existieren verschiedene Modelle, und damit auch verschiedene Begriffe, zur Interpretation dieses stationären Zustands:

- (i) die Zellen sind in einer "verlängerten  $G_1$  Phase" und können deshalb nicht von den Zellen in  $G_1$  unterschieden werden (Prescott 1968),
- (ii) die Zellen sind in einem andern physiologischen Zustand, der mit  $G_0$  bezeichnet wird (Sander und Pardee 1972),
- (iii) nach der Mitose gehen alle Zellen in einen Wahrscheinlichkeitszustand A über, und die Übergangswahrscheinlichkeit in den B Zustand ist bei stationären Zellen sehr gering (Smith und Martin 1973).

#### 1.2.2. Experimentelle Ergebnisse bei stationären Zellkulturen

Hinweise auf die Instabilität der DNA bei stationären Zellkulturen liefern die Kontrolluntersuchungen bei Reparaturstudien an stationären Zellkulturen (Kap. 1.2.2.1), bei der Stimulierung der Zellteilung bei kultivierten Säugerzellen in stationärem Zustand (Kap. 1.2.2.2.) und bei Untersuchungen der DNA-Markierung als Funktion des Kulturalters (Kap. 1.2.2.3.).

##### 1.2.2.1. Untersuchung der DNA-Reparatur

In Arbeiten, bei denen der Einbau von  $H\text{-}^3\text{dThd}$  in die DNA als Maß für die Reparaturaktivität bei konfluenten Zellsystemen gemessen wird, kann auch bei den nicht bestrahlten Zellen ein Einbau beobachtet werden. Diese beobachtete Reparaturaktivität in den unbehandelten Zellen schwankt zwischen 5 und 29 %; und die Höhe ist vom Grad der induzierten DNA-Schäden in den behandelten Zellen abhängig (Zipfel et al. 1982). Der Einbau in die Kontrollzellen wurde ursprünglich als Reparatur-Replikation in den unbehandelten Zellen angesehen (Painter et al. 1970) und danach als Artefakt interpretiert, nach dem gezeigt wurde, daß die spezifische Aktivität der parentalen DNA von unbestrahlten Hela- und CHO Zellen durch Rebanding in alkalischen  $\text{CsCl}$  Gradienten abnimmt (Gautschi

et al. 1972). Dabei ist allerdings die Stationarität des zellulären Systems nicht genau charakterisiert und aus den unvollständigen Angaben bezüglich des Zellwachstums kann geschlossen werden, daß die Zellen nicht in stationärem Zustand waren und replikative DNA-Synthese durchführten.

Obwohl in anderen Studien durch CsCl Zentrifugation bei annähernd konfluenten WI-38 Zellen DNA-turnover nicht direkt nachgewiesen werden konnte, zeigten alle unbestrahlten Zellen Reparaturaktivität, die durch Hydroxyharnstoff nicht vollständig gehemmt werden konnte (Smith und Hanawalt 1976A) und markierte DNA, die im Bereich der parentalen DNA sedimentierte (Smith und Hanawalt 1976B).

#### 1.2.2.2. Stimulierung der DNA-Synthese und der Zellteilung

Untersuchungen über den Übergang von ruhenden, stationären Zellen, zu teilenden Zellen sind vor allem bei WI-38 - und 3T3 Zellen durchgeführt worden. Durch Zugabe von frischem Wachstumsmedium oder Serum wird ein Teil der Zellen zur DNA-Synthese und anschließender Zellteilung stimuliert (Wiebel und Baserga 1969). Etwa 15 h nach der Stimulierung beginnt die DNA-Synthese und nach etwa 25 h können mitotische Zellen beobachtet werden (Farber et al. 1971).

Ebenso wie bei nicht bestrahlten, konfluenten Zellen, ist auch bei diesen Experimenten ein Einbau von H-3dThd in die DNA der unstimulierten, konfluenten Zellen vorhanden. Diese Ergebnisse sind in Tab. 1.3. zusammengestellt.

Die Schwankung des Einbaus in die DNA der unstimulierten Zellen (1 - 8 % Einbau im Vergleich zu den stimulierten Zellen) kann durch unterschiedliche Stimuli erklärt werden, da der Anteil der stimulierten Zellen von der Art des Stimulus abhängt (Rovera und Baserga 1973, Farber et al. 1971).

| Zellen                 | Stimulus         | Einbau in die<br>unstimulierten Zellen<br>im Verhältnis<br>zum Einbau in die<br>stimulierten Zellen<br>[%] | Referenz                |
|------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 6.7                                                                                                        | Wiebel und Baserga 1969 |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 8.9                                                                                                        | Rovera und Baserga 1973 |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 1.1                                                                                                        | Rossini et al. 1975     |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 6.6                                                                                                        | Heby et al. 1975        |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 5.0                                                                                                        | Bartholomew et al. 1976 |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 2.4                                                                                                        | Bombik und Baserga 1976 |
| 3T3                    | Med. + 10 % f.S. | 1.5                                                                                                        | Todaro et al. 1965      |
| 3T3                    | Med. + 40 % f.S. | 4.0                                                                                                        | Yeh und Fischer 1969    |
| Fibroblasten<br>(Huhn) | Med. + 16 % f.S. | 26.0                                                                                                       | Temin 1971              |
| Glioma ähnliche Zellen | Med. + 40 % f.S. | 8.5                                                                                                        | Lindgren et al. 1975    |

Tab. 1.3 Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten, unstimulierten Zellen.

Konfluente Zellen wurden mit verschiedenen Stimuli zur Zellteilung stimuliert, und der Verlauf der DNA-Synthese zu verschiedenen Zeiten, durch den Einbau von H-3dThd in die DNA beobachtet. Der Einbau in die DNA der unstimulierten Zellen ist der prozentuale Anteil zum Einbau bei maximaler DNA-Synthese. (f.S. = fötales Serum).

#### 1.2.2.3. Untersuchung der DNA-Markierung als Funktion des Kulturalters

Bei Markierung der DNA zu verschiedenen Zeiten nach dem Einimpfen der Zellen kann auch nach Erreichen der stationären Phase (Zellzahl konstant) bei humanen Amnion Zellen (Kohn 1968), humanen Fibroblasten (Levine et al. 1965) und bei CHO-Zellen (Hahn et al. 1968) ein Einbau von H-3dThd in die DNA beobachtet werden.

Die Gründe für den Einbau werden nicht näher analysiert, sie können sowohl durch DNA-turnover, als auch durch Zellteilung erklärt werden.

### 1.2.3. Immobilisierte Zellen als stationäres Zellsystem

Für Studien an stationären Zellen sollten immobilisierte Zellen ein geeignetes System darstellen.

BHK 21 Zellen wachsen als Monolayer Kulturen, und beim Erreichen einer hohen Zellzahl stellen die Zellen das Wachstums ein und gehen in einen stationären Zustand über (Kap. 1.2.1.). Die Mechanismen, die zur dichtebedingten Hemmung des Zellwachstums führen, sind nicht bekannt. Es ist möglich, daß der Zell-Zell Kontakt, und eventuell die Bildung von zelleigenen Wachstumsinhibitoren (Chalone) diese Wachstums hemmung bedingen.

Da BHK 21 Zellen nur als Monolayer-Kulturen wachsen, kann durch die Immobilisierung in einer geeigneten Matrix ein stationäres Zellsystem erreicht werden, da:

- (i) der Zell-Zell Kontakt künstlich durch den Zell-Alginat Kontakt imitiert wird,
- (ii) die Zellen aus sterische Gründen an der Zellteilung gehindert werden.

Ca-Alginat bildet eine geeignete Matrix zur Immobilisierung von BHK 21 Zellen (Mannes 1984), und somit sollten in Ca-Alginat immobilisierte Zellen ein geeignetes, stationäres System zur Untersuchung des DNA-turnovers bilden.

Zusätzliche Vorteile der Immobilisierung ganzer Zellen in Partikeln sind die hohe mechanische Stabilität, die durch die Immobilisierung erreicht wird, und die hohe Zelldichte pro Partikel, die auch den Einsatz von tierischen Zellen für die Produktion von bestimmten Proteinen (Bs. Immunglobuline und Lymphokine (Nilson et al. 1983)) erlauben.

Einige Proteine werden speziell in der  $G_1$  bzw.  $G_0$  Phase synthetisiert und deshalb ist ein stationäres Zellsystem, mit einer hohen Zelldichte auch für die Produktion solcher Proteine interessant.

### 1.3. Einbau von H-3 und C-14 aus anorganischen und organischen Vorstufen in die DNA

H-3 und C-14 von anorganischen (HTO) und organischen (C-14 O<sub>2</sub>) Quellen können bei jedem biologischen System in alle organischen Moleküle eingebaut werden (Stryer 1981). Somit können bei chronischer Exposition alle H- und C-Atome durch diese radioaktiven Nuklide ersetzt werden.

Die von anorganischen oder organischen Quellen in das biologische Material eingebaute Menge an H-3 und C-14 kann bestimmt werden durch:

- (i) Metabolische Modelle, wie im ICRP Report Nr. 30 (ICRP 1979) vorgeschlagen, wobei das organisch gebundene H-3 oder C-14 nicht berücksichtigt wird, oder
- (ii) das Konzept der spezifischen Aktivität. Das Konzept der spezifischen Aktivität besagt, daß während chronischer Exposition, nach Erreichen des steady states, die spezifische Aktivität (i.e. das Verhältnis H-3/H-1, bzw. C-14/C-12) aller H- und C-Atome der Moleküle, in die H-3 und C-14 eingebaut werden können, gleich der spezifischen Aktivität der anorganischen oder organischen Quelle ist.

Durch das Konzept der spezifischen Aktivität können die Dosifaktoren von H-3 und C-14 berechnet werden, ohne metabolische Daten zu berücksichtigen, wie es in den genannten ICRP Richtlinien getan wird.

Dies ist auch von Bedeutung um das Risiko dieser Nuklide zu beurteilen, die in zunehmendem Maße produziert und benutzt werden.

Bei der Untersuchung des Konzepts der spezifischen Aktivität, muß der Einbau von H-3 und C-14 aus anorganischen und organischen Vorstufen in die DNA bei stationären (nicht teilenden) und teilenden Zellen untersucht werden.

Die Gültigkeit dieses Konzepts ist für das organische Kompartiment noch nicht detailliert nachgeprüft. Für eine solche Arbeit ist die DNA das geeignete organische Molekül, da es das kritische Target für H-3 und C-14 Nuklide darstellt, sowie seine chemische Struktur und biochemischen Synthesewege bekannt sind (Kornberg 1980).

In Versuchen bei Ratten (Pietrzak-Flis et al. 1982) bzw. bei Kaninchen (Pietrzak-Flis et al. 1978), die mit HTO oder tritiiertem Nahrung gefüttert wurden, war die spezifische Aktivität des organisch gebundenen H-3 in der Gruppe am höchsten, die mit organisch gebundenem H-3 gefüttert wurde. Die spezifische Aktivität in der DNA wurde allerdings nicht bestimmt.

Die Markierung der DNA mit H-3 nach HTO Exposition ist bei Fischeiern (Ueno 1974), bei DNA aus Mausleber (Hatch und Mazrimas 1972) und im Chromatin von verschiedenen Mausgeweben (Commerford et al. 1977, 1982a) nachgewiesen. Diese Ergebnisse können jedoch nicht zur Bestätigung des Konzepts der spezifischen Aktivität benutzt werden, da die H-3 Aktivität nicht von der isolierten DNA bestimmt wurde, oder die eingesetzte H-3 Aktivität so hoch war, daß eine Schädigung der DNA durch die inkorporierten Nuklide nicht ausgeschlossen werden kann. Es existieren keine Literaturstudien zur spezifischen Aktivität von C-14 während des Metabolismus.

### 1.3.1. Theoretische Bestimmung der spezifischen Aktivität

#### 1.3.1.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Vorstufen

Das Konzept der spezifischen Aktivität besagt, daß nach Erreichen des steady states, die spezifische Aktivität der Vorstufe gleich der spezifischen Aktivität des Endprodukts (DNA) ist.

Unter Berücksichtigung der Verdünnung der einzelnen Vorstufen in verschiedenen Kompartimenten während des Metabolismus kann die spezifische Aktivität der Vorstufe nach Gleichung (1.1.) berechnet werden:

$$SA_P = \frac{\text{Aktivität des Mediums (Trinkwasser)}}{\text{Poolgröße}} \left[ \frac{\text{Bq}}{\text{mol}} \right] \quad (1.1.)$$

Da nur eine trophische Ebene betrachtet wird, können nicht alle H- oder C-Atome während des Experiments markiert werden, und deshalb muß der Metabolismus der einzelnen Vorstufen im Detail untersucht werden, um nachzuweisen, welches H- oder C-Atom ersetzt werden kann. Da H-3, das an N oder O gebunden ist, über Säure-Basen Gleichge-

wichtsreaktionen ausgetauscht werden kann, wird nur das an C-gebundene H berücksichtigt. Der Metabolismus der einzelnen Vorstufen und ihre Verdünnung in den verschiedenen Kompartimenten wird für jede einzelne Vorstufe bestimmt.

#### 1.3.1.2. Bestimmung der theoretischen spezifischen Aktivität der DNA

Die theoretische spezifische Aktivität der DNA kann nach Gleichung (1.2.) berechnet werden; i.e. die spezifische Aktivität der Vorstufe, unter Berücksichtigung der verschiedenen metabolen Wege.

$$SA_{\text{theor.}} = \sum_i \alpha_i \cdot \beta_i \cdot \gamma_i \cdot SA_P \left[ \frac{\text{Bq}}{\text{mol Nukleotid}} \right] \quad (1.2.)$$

Dabei ist für den Markierungsweg (i):

- $\alpha_i$  - der Anteil an H-3 oder C-14 der markierten Vorstufe, der in die Nukleotide eingebaut werden kann,
- $\beta_i$  - Anteil der Nukleotide, in die H-3 oder C-14 eingebaut werden kann,
- $\gamma_i$  - Anzahl der C-H oder C-Atome, die über den Markierungsweg (i) markiert werden können

Die einzelnen Werte  $\alpha_i$ ,  $\beta_i$  und  $\gamma_i$  der verschiedenen Vorstufen können aus Biosynthesewegen berechnet werden und sind in Tab. 1.4: zusammengestellt.

#### 1.3.1.3. Metabolismus von HTO

Die metabolischen Wege, über die H-3 von HTO während der Nukleotidbiosynthese in die DNA eingebaut werden kann sind in Fig. 1.2. dargestellt.

Oxalacetat ist das wichtigste Zwischenprodukt, das mit H-3 von HTO

| Precursor            | Markiertes Molekül | Markierungsweg                                               | Nr. | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | $\alpha, \beta, \gamma$ |
|----------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------|-----|----------|---------|----------|-------------------------|
| HTO                  | Pyrimidin Nukleot. | via Oxalacetat                                               | 1   | 1.00     | 0.50    | 1.00     | 0.50                    |
|                      | Cytidin            | via Orotat                                                   | 2   | 1.00     | 0.25    | 1.00     | 0.25                    |
|                      | Thymidin           | via N <sup>5</sup> , N <sup>10</sup> Methylentetrahydrofolat | 3   | 1.00     | 0.25    | 2.00     | 0.50                    |
|                      | Purin Nukleotide   | via N <sup>5</sup> , N <sup>10</sup> Methylentetrahydrofolat | 4   | 1.00     | 0.50    | 1.00     | 0.50                    |
|                      | Desoxyribosen      | via Pentose Phosphat-Zyklus, nichtoxidativer Weg             | 5   | 1.00     | 1.00    | 3.00     | 3.00                    |
| D-[1-H-3] glucose    | Cytidine           | via Tricarbonsäure Zyklus                                    | 1   | 0.50     | 0.25    | 1.00     | 0.125                   |
|                      | Desoxyribose       | via Pentose Phosphat-Zyklus, nichtoxidativer Weg             | 2   | 1.00     | 1.00    | 1.00     | 1.00                    |
|                      | Thymidin           | via N <sup>5</sup> , N <sup>10</sup> Methylentetrahydrofolat | 3   | 0.50     | 0.25    | 1.00     | 0.125                   |
|                      | Pyrimidin Nukl.    | via Tricarbonsäure-Zyklus                                    | 1   | 0.50     | 0.50    | 1.00     | 0.25                    |
| D-[U-C-14] glucose   | Desoxyribose       | via Pentose Phosphat-Zyklus                                  | 2   | 0.83     | 1.00    | 1.00     | 0.83                    |
|                      | Pyrimidin Nukl.    | via Tricarbonsäure-Zyklus                                    | 1   | 0.50     | 0.25    | 1.00     | 0.125                   |
| L-[2,3-H-3] aspartat |                    |                                                              |     |          |         |          |                         |

Tab. 1.4. Korrekturfaktoren für die theoretische Bestimmung der spezifischen Aktivität

markiert wird. Während des Tricarbonsäure-Zyklus wird H-3 von HTO an Isocitrat und Malat gebunden. Aus diesen Vorstufen wird Oxalacetat gebildet, das via Aspartat in die Pyrimidine eingebaut wird. Über diesen Weg wird das C-6 Atom von Cytidin- und Thymidin-Nukleotiden markiert, und es ergibt sich:

$$\alpha_1 = 1.00, \quad \beta_1 = 0.50 \quad \text{und} \quad \gamma_1 = 1.00$$

Während der Biosynthese der Pyrimidin-Nukleotide wird bei der Decarboxylierung von Orotat ein weiteres H-3 Nuklid an die C-5 Position eingebaut. Diese Markierung ist nur bei Cytidin vorhanden, und deshalb ist:

$$\alpha_2 = 1.00, \quad \beta_2 = 0.25 \quad \text{und} \quad \gamma_2 = 1.00$$

Während der Gluconeogenese wird Oxalacetat über Phosphoenolpyruvat zu 3-Phosphoglycerat, wobei ein zusätzliches H-3 Nuklid von HTO eingebaut wird. Bei diesem Schritt kann eine Verdünnung im Glucose- und Aminosäuren-Pool erfolgen.

3-Phosphoglycerat ist die Vorstufe von Serin, von dem die Methylgruppe auf N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methylentetrahydrofolat übertragen wird. Über diesen Weg wird die Methylgruppe des Thymidins markiert und es ergeben sich die Faktoren:

$$\alpha_3 = 1.00, \quad \beta_3 = 0.25 \quad \text{und} \quad \gamma_3 = 2.00$$

Über den gleichen Weg, via N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methenyltetrahydrofolat werden die Purinnukleotide am C-8 Atom markiert:

$$\alpha_4 = 1.00, \quad \beta_4 = 0.50 \quad \text{und} \quad \gamma_4 = 1.00$$

Desoxyribose kann via Gluconeogenese und durch den Pentosephosphat-Zyklus synthetisiert werden. Die H-3 Markierung von 3-Phosphoglycerat werden beim nicht oxidativen Pentosephosphat-Zyklus übertragen. Das Verhältnis oxidativ vs. nichtoxidativen Pentose-Phosphat-Zyklus ist gewebespezifisch und es liegen keine exakten Daten für die einzelnen Gewebe vor. Deshalb kann die Markierung der Desoxyribose nicht exakt berechnet werden. Die Werte für den oxidativen Pentosephosphat-Zyklus sind:

$$\alpha_5 = 1.00, \quad \beta_5 = 1.00 \quad \text{und} \quad \gamma_5 = 3.00$$

Labeling of nucleotides from  $\text{H}_2\text{O}$

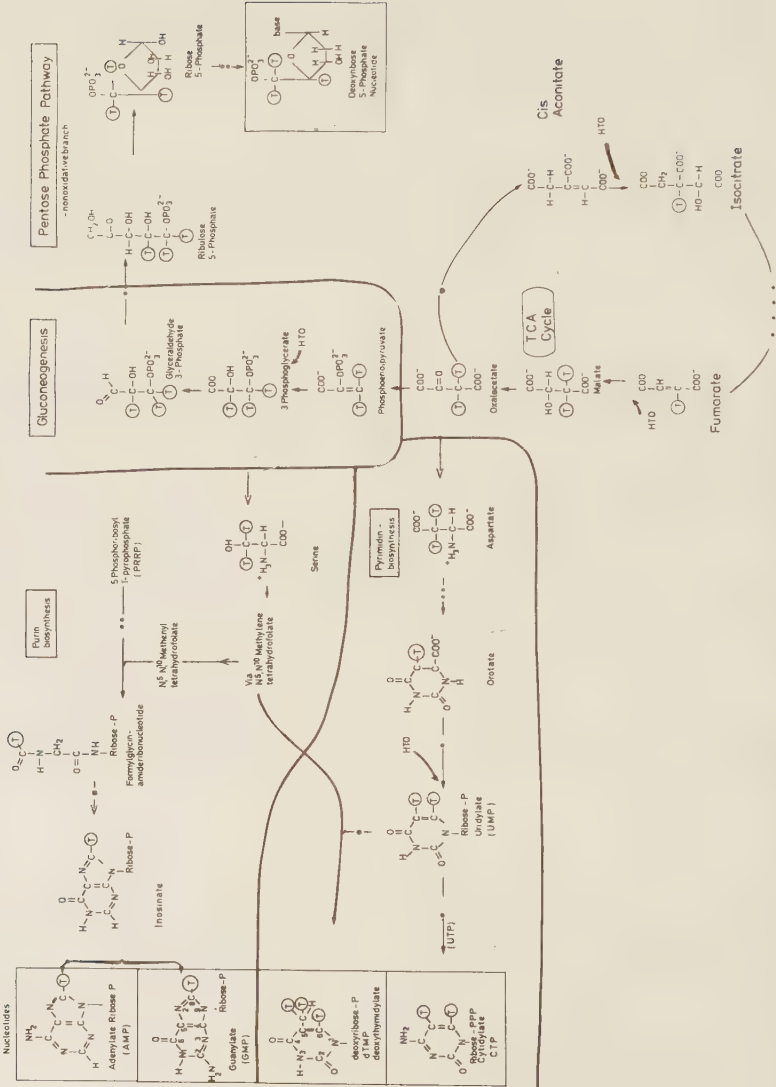


Fig. 1.2. Stoffwechselwege, durch die  $\text{H}_2\text{O}$  während der Biosynthese kovalent an Bausteine der DNA gebunden werden.

Die theoretische Berechnung der spezifischen Aktivität der DNA ist mit einem Fehler behaftet, da die Verdünnung von Phosphoenolpyruvat mit Glucose und Aminosäuren nicht exakt bestimmt werden kann. Auch ist das Verhältnis von oxidativem vs. nicht oxidativem Pentosephosphat-Zyklus nicht genau bekannt.

Der Wasseranteil in der Nahrung von 13 % ist bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität der Vorstufe berücksichtigt worden.

#### 1.3.1.4. Metabolismus von D-[1-H-3]glucose

Die metabolischen Wege durch die H-3 von D-[1-H-3]glucose bei der Nukleotidsynthese in die DNA eingebaut werden, sind in Fig. 1.3. dargestellt.

DNA kann über zwei verschiedene Wege markiert werden:

Die C-H-3 Gruppe am C-1 Atom kann in das C-5 Atom des Cytidins eingebaut werden, via Glycolyse  $\rightarrow$  Tricarbonsäure-Zyklus  $\rightarrow$  Aspartat. Nur die Hälfte der so gebildeten Moleküle enthält H-3. Für diesen Markierungsweg ergibt sich:

$$\alpha_1 = 0.50, \quad \beta_1 = 0.25 \quad \text{und} \quad \gamma_1 = 1.00$$

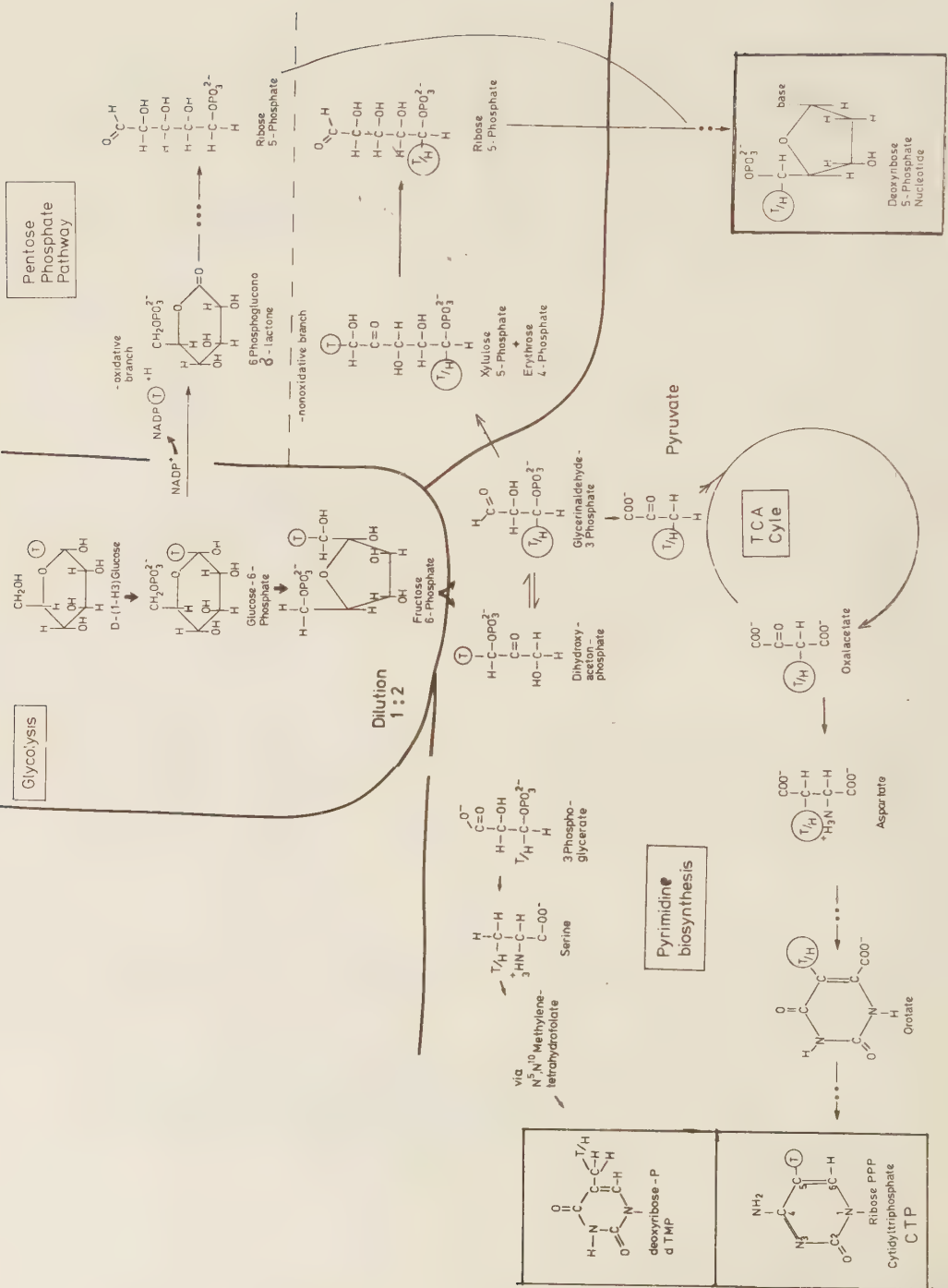
Desoxyribose kann am C-5 Atom mit H-3 von D-[1-H-3]glucose über den oxidativen Pentosephosphat-Zyklus markiert werden. Wenn Desoxyribose über den oxidativen Weg gebildet wird, findet eine Übertragung des H-3 Atoms von C-1 auf NADPH statt. Für den nichtoxidativen Weg des Pentosephosphat-Zyklus ist:

$$\alpha_2 = 1.00, \quad \beta_2 = 1.00 \quad \text{und} \quad \gamma_2 = 1.00$$

Das H-3 Atom kann über Glycerinaldehyd 3-Phosphat  $\rightarrow$  Serin  $\rightarrow$   $N^5, N^{10}$  Methylentetrahydrofolat auf die Methylgruppe des Thymidins übertragen werden.

$$\alpha_3 = 0.50, \quad \beta_3 = 0.25 \quad \text{und} \quad \gamma_3 = 1.00$$

Bei den Tieren kann mit Aminosäuren und Lipiden eine teilweise Verdünnung der Glucose während des Stoffwechsels auftreten.



#### 1.3.1.5. Metabolismus von D-[U-C-14]glucose

Die Markierung der einzelnen Nukleotide mit C-14 von D-[U-C-14]glucose findet über die gleichen Stoffwechselwege wie bei der D-[1-H-3]glucose statt (Fig. 1.3. ). Da D-[U-C-14]glucose einheitlich markiert ist, werden die Teile des Kohlenstoffskeletts bei der Pyrimidinsynthese eingebaut. Für die Markierung über den Tricarbonsäure-Zyklus lauten die Faktoren:

$$\alpha_1 = 0.50, \quad \beta_1 = 0.50 \quad \text{und} \quad \gamma_1 = 1.00$$

Für die Markierung der Desoxyribosen:

$$\alpha_2 = 0.83, \quad \beta_2 = 1.00 \quad \text{und} \quad \gamma_2 = 1.00$$

Die Markierung mit D-[U-C-14]glucose ist komplexer als die Markierung mit D-[1-H-3]glucose und kann nicht exakt berechnet werden. Das Kohlenstoffskelett ist stabiler als eine einzelne H-3 Markierung, weshalb auch noch andere Moleküle wie z.B. Aminosäuren und Lipide durch D-[U-C-14]glucose markiert werden. Wenn diese Moleküle weiter metabolisiert werden, können während der Nukleotidsynthese auch noch zusätzlich C-Atome markiert werden.

Trotz dieser Nachteile wurde D-[U-C-14]glucose als Kontrolle verwendet, ob gebundenes oder austauschbares H-3 bei der Verwendung anderer Vorstufen gemessen wurde.

Bei der Bestimmung der Poolgröße wurde die Verdünnung von D-[U-C-14]glucose mit Aminosäuren und Lipiden während des Tricarbonsäure-Zyklus berücksichtigt.

#### 1.3.1.6. Metabolismus von L-[2,3-H-3]Aspartat

Die Aminosäure Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Tricarbonsäure-Zyklus gebildet. Nur die H-3 Markierung am C-2 Atom von Aspartat wird an das C-3 Atom von Cytidin eingebaut. Die Korrekturfaktoren sind:

$$\alpha_1 = 0.50 \quad \beta_1 = 0.25 \quad \text{und} \quad \gamma_1 = 1.00$$

Bei der Bestimmung der Poolgröße wurde die Verdünnung im Tricarbonsäure-Zyklus mit Glucose und Aminosäuren berücksichtigt.

#### 1.4. Experimentelle Ziele

Im experimentellen Teil der Arbeit soll:

- (i) die Rate des DNA-turnovers bei verschiedenen Zellsystemen bestimmt werden,
- (ii) der Einbau von H-3 und C-14 aus anorganischen und organischen Vorstufen in die DNA theoretisch und experimentell untersucht werden.

Für die experimentelle Untersuchung des DNA-turnovers müssen nicht teilende Zellsysteme verwendet werden, da bei diesen Systemen die DNA-Replikation minimal ist und nur so die exakte Rate des DNA-turnovers ermittelt werden kann.

Deshalb ist es wichtig die verwendeten, stationären nicht teilende System hinsichtlich ihrer Stationarität zu charakterisieren und Zellteilung oder DNA-Replikation auszuschließen, bzw. ihre Rate zu bestimmen.

Der Nachweis des DNA-turnovers ist mit methodischen Problemen verbunden, und, da die Existenz des DNA-turnovers umstritten ist und teilweise auf methodische Artefakte zurückgeführt wird, ist der Einsatz von verschiedenen, unabhängigen Methoden in einem bezüglich Zellteilung und DNA-Replikation exakt charakterisierten System, notwendig.

Der Einbau von H-3 und C-14 aus anorganischen und organischen Vorstufen in die DNA soll theoretisch auf Grund der bekannten biochemischen Pathways berechnet werden, und das erstellte Modell soll experimentell überprüft werden.

Da die Markierung der DNA sowohl durch DNA-Replikation wie auch über DNA-turnover stattfinden kann, sollen für diese Untersuchung sowohl an nichtteilenden und teilenden Zellen durchgeführt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Zellen

MRC-5 Zellen (von Dr. J. Bullerdiek, Universität Bremen) und BHK 21/C-13 Zellen 50 - 80 te Passage (Flow, Seromed) wurden kultiviert in L-15 Medium (Flow, Gibco), supplementiert mit 100 000 E/l Penicillin, 100 000 µg/ml Streptomycin (Seromed, Flow), 1.25 µg/ml Fungizid (Amphotericin B) (Flow, Gibco) und wenn nicht anders angegeben mit 10 % (v/v) Kälberserum (fötal und newborn) (Seromed, Gibco, Boehringer).

Hamster Fibroblasten (V79/C1 1) (Sturelid 1971) wurden kultiviert in Eagles MEM mit Hanks Salzen (Seromed) mit 10 % newborn Serum, und CHO Zellen (von Dr. H. Amneus, Institut für Genetik, Uppsala) in Eagles MEM mit Hanks Salzen und 20 % fötalem Kälberserum (Boehringer). Bei beiden wurden die gleichen Mediumzusätze verwendet wie beim L-15 Medium beschrieben.

#### 2.1.2. Zellkultivierung

Für die normale Zellkultur wurden die Zellen in Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) (Becton und Dickinson, Nunc) bei 37° C kultiviert, und einmal wöchentlich im Verhältnis 1 : 10 überimpft. Zum Ablösen wurden die Zellen routinemäßig mit zweimal 5 ml PBS-Puffer 8000 mg/l NaCl, 200 mg/l KCl, 1440 mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 200 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.8) gewaschen und mit 2 ml Trypsinlösung (kristallines Trypsin E.C. 3.4.21.4 (Novo), 50 µg/ml in PBS) für 2 min behandelt (Kasche et al. 1981A). Die Trypsinlösung wurde abgossen, und die Zellen bis zum Ablösen nach ca. 10 min bei 37° C inkubiert.

Medium, Serum wurden vor Gebrauch zweimal sterilfiltriert (Cellulosenitrat Filter 0.2 µm Porendurchmesser (Sartorius)). PBS wurde autoklaviert und die Trypsinstammlösung (in 0.1 M HCl) mit

einem Einmalsterilfilter (Millipore) und einer Spritze sterilfiltriert und anschließend in PBS verdünnt.

#### 2.1.3. Tiefgefrieren der Zellen

Kultivierte Zellen wurden wie beschrieben trypsinisiert und in Wachstumsmedium aufgenommen (Konzentration  $1 - 4 \cdot 10^6$  Zellen/ml) und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gehalten. DMSO wurde zu einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugegeben, und die Zellen wurden mit einer Spritze in sterile Ampullen (Wheaton) überführt. Die Ampullen wurden zugesmolzen und in einer Polystyrolbox für 12 h bei  $-23^{\circ}\text{C}$  gehalten, i.e. Abkühlung von ca.  $1^{\circ}\text{C/min}$ . Anschließend wurden die Zellen entweder bei  $-196^{\circ}\text{C}$  oder bei  $-85^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.1.4. Auftauen der Zellen

Die bei  $-85$  und  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen wurden in  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasser aufgetaut; die Ampullen mit Alkohol 70 % (v/v) abgerieben und die Zellsuspension in ein Kulturgefäß mit 20 ml Wachstumsmedium überführt. Nach 24 h, wenn die Zellen angewachsen waren, wurde das Wachstumsmedium gewechselt.

#### 2.2. Tierhaltung

Es wurden Mäuse (NMRI, Eklund Tierfarm, Schweden) ca. 30 Tage alt, verwendet. Jeweils 3 Tiere gleichen Geschlechts wurden in einem Käfig gehalten. Die Tiere erhielten 160 KBq/ml HTO (3.33 KBq/mol), 18.5 KBq/ml D-[1-H-3]glucose (18.5 GBq/mmol) oder 3.4 KBq/ml D-[U-C-14]glucose (114MBq/mmol) (alle Amersham Buchler) während der ersten 112 Tage des Experiments mit dem Trinkwasser. Durch die Registrierung des Verbrauchs an Trinkwasser und Futter (Ewos, Schweden; Glucose Gehalt ca. 17 % (w/w) und Wasseranteil 12 % (w/w)) wurde die verbrauchte Menge des jeweiligen Nuklids und dessen spezifische Aktivität ermittelt.

## 2.3. DNA-Isolierung und Charakterisierung

### 2.3.1. Quantitative DNA-Isolierung nach Kasche et al. (1981B)

**Bestimmung der Zellzahl:** Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen zweimal mit 1.5 ml Homogenisierungspuffer (0.15 M Na-Phosphat, 0.024 M EDTA, pH 7.9) mit einer Spritze aus dem Kulturgefäß in ein konisches Reagenzglas überführt und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer (0.1 mm) bestimmt.

**Homogenisierung:** Die Zellen oder das Gewebe (100 - 200 mg) wurden in 3 ml Homogenisierungspuffer bei 50 Watt (Branson Sonifier B 12, Microspitze) bei 4<sup>o</sup> C für 3 - 4 min in einem konischen Reagenzglas beschallt.

**Deproteinisierung:** Das Homogenat wurde zu einer Suspension von immobilisierter Proteinase K (E.C. 3.4.21.14, 10 mg) und 5 ml Deproteinisierungspuffer (0.15 M Na-Phosphat, 2 M NaCl, pH 9) zugegeben und 20 h bei 37<sup>o</sup> C mit einem Rotary Mixer rotiert. Danach wurden die Proben filtriert (Polypropylene Econo Columns; Biorad), um die Proteinase abzutrennen.

**DNA-Isolierung:** Das Filtrat der deproteinisierten Probe wurde auf eine Ionenstärke von 0.05 verdünnt und 30 min mit 4 ml Hydroxylapatite (DNA-grade ;BioRad, Boehringer-Mannheim) (1:2 Gemisch vorgequollen in 0.15 M Na-Phosphat, pH 6.8) geschüttelt. Die Suspension wurde in einem Vielfachfiltrationsgerät (Millipore) mit EHWP 25 Filtern (Millipore) filtriert. Das zurückgehaltene Hydroxylapatite an dem die DNA gebunden ist, wurde zuerst mit Puffer geringer Ionenstärke (0.15 M Na-Phosphat, pH 6.8) 5 x 2 ml und 1 x 2 ml gewaschen, um gebundene Aminosäuren und RNA abzulösen. Anschließend wurde die DNA mit höherer Ionenstärke (0.5 M Na-Phosphat, pH 6.8) 3 x 2 ml und 2 x 2 ml abgelöst.

### 2.3.2. DNA-Extraktion (modifiziert nach Marmur (1961))

Für die Extraktion hochmolekularer DNA wurden die Zellen wie beschrieben isoliert. Statt des Homogenisierungspuffers wurde TEN Puffer (0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5) verwendet. Proteinase K (nicht immobilisiert; Merck) wurde zu einer Endkonzentration von 500 µg/ml, RNase A (E.C. 3.1.27.5; ~ 100 Kunitz U/mg; Serva) (Stammlösung 10 min bei 100° C) zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml und SDS 0.5 % (w/v) zugegeben und die lysierten Zellen 2 - 5 h bei 37° C inkubiert. Die DNA wurde einmal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) bei Raumtemperatur und zweimal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Das Phenol wurde in TEN Puffer gelöst und anschließend wurde die wässrige Phase entfernt. Zur Extraktion wurden die Proben 2 min durch Rollen durchmischt und alle 30 sec belüftet. Danach wurden die beiden Phasen durch Zentrifugieren (Minifuge 5000 rpm, 7 min) getrennt und die wässrige Phase vorsichtig mit einer kurzen Pasteurpipette abgehoben.

Nach der Extraktion wurde die DNA durch Zugabe von Na-Acetat pH 8 (Endkonzentration 0.3 M) und eiskaltem Ethanol (-23° C, Endkonzentration 70 % (v/v)) ausgefällt.

Die direkt ausgefällte DNA wurde um einen Glasstab gewunden und in SSC Puffer (0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat, pH 7.0) gelöst. Da nicht alle DNA direkt ausfällt, wurde die Probe über Nacht bei -23° C gehalten und die ausgefällte DNA durch Zentrifugieren (Sorvall, HB4 Rotor, 10 000 rpm, 15 min, -20° C) abgetrennt. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet ebenfalls in SSC Puffer gelöst.

### 2.3.3. Spektralphotometrische Bestimmung und Charakterisierung der DNA

Von allen isolierten DNA Proben wurde das UV Spektrum im Bereich von 220 - 330 nm gemessen (Gilford Spektralphotometer 250). Für jedes Spektrum wurde die Nulllinie korrigiert und zu Anfang

eine Küvettenkorrektur durchgeführt. Die DNA Konzentration wurde nach Hirschmann und Felsenfeld (1966) bestimmt, wobei für doppelsträngige DNA (1 mg/ml) in 0.5 M Na-Phosphat, pH 6.8 eine Absorbanz von 20.8 zu Grunde gelegt wurde (Zipfel 1980). Die DNA war doppelsträngig, was durch Schmelzkurven bestimmt wurde.

#### 2.3.4. Schmelzkurven

Schmelzkurven wurden mit einer Schmelzküvette und mit Thermo-programmer (Gilford 2527) ausgestatteten Gilford Photometer bei einer Erwärmung von  $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$  durchgeführt. Zum Vergleich der Schmelzpunkte wurde die mit Hydroxylapatite isolierte DNA über eine Gelsäule (BioGel P2, BioRad) in SSC-Puffer umgepuffert. Zur Bestimmung des hyperchromatischen Effekts wurden die Proben nicht umgepuffert, sondern direkt in 0.5 M Na-Phosphat Puffer untersucht.

#### 2.3.5. Gelelektrophorese der DNA

Die verwendete Gelbrücke trennt in horizontaler Richtung und wurde nach Angaben von Meyer (1980) selbst angefertigt. Die Agarose (1 % (w/w), HGT ; Seakem) wurde in TriNac Puffer (0.04 M Tris-HCl, 0.02 M Na-Acetat, 0.002 M EDTA, pH 7.8) unter Kochen gelöst. Das Gießen des Gels mit der auf  $65^{\circ}\text{C}$  abgekühlten Agarose erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurden die 'Füße' gegossen, und nach Polymerisierung der Agarose im zweiten Schritt das Trenngel (20 x 20 x 0.5 cm). In die vorgeformten Taschen wurden vorsichtig 50  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung, versetzt mit 20 % (v/v) Bromphenolblau (50 % (v/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau in Tri-Nac Puffer) pipettiert und der Lauf bei geringer Spannung (1 V/cm) gestartet, bis die DNA in das Gel eingedrungen war (ca. 15 min). Danach wurde das Gel mit Folie abgedeckt und bei ca. 3 V/cm (Spannung im Gel) für 4 - 6 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  elektrophoretisch

siert. Während der Elektrophorese fand eine Umwälzung der Elektrodenpuffer statt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Brücke herausgelöst und in TriNac Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) für 30 min bei leichter Bewegung angefärbt.

Danach wurde das Gel auf einen Illuminator (Chroma 42 ;Vetter) gelegt und von unten mit UV Licht belichtet, und mit einer Polaroidkamera (MP-4; Polaroid) fotografiert (Polaroidfilm Nr. 665, schwarz-weiß).

#### 2.3.6. Dichtegradientenzentrifugation

Die extrahierte und ausgefällte DNA (Kap. 2.3.2.) wurde in SSC Puffer gelöst. Zu 6.63 g CsCl (optical grade ; Serva, Sigma) wurden ca. 4.8 ml DNA-Lösung und SSC Puffer gegeben, der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 12.8 eingestellt und die Ausgangsdichte von 1.720 g/cm<sup>3</sup> durch Wiegen eingestellt. Die Zentrifugation der Proben erfolgte in Polyallomer Röhrchen (Beckman) in einem TI 50 Rotor (Beckman) bei 40 Krpm für mindestens 100 h bei 20° C (Kontron TGA-75, Beckman L5-65).

Nach dem Zentrifugieren wurden die Röhrchen angestochen und jeweils 20 Tropfen in einem Reagenzglas gesammelt. Nach Zugabe von 1 ml SSC Puffer erfolgte die Bestimmung des UV Spektrums und der Radioaktivität.

#### 2.3.7. Flüssigkeitsscintillations- Messung

DNA aus tierischen Geweben: 1 ml der DNA-Lösung wurden in einem Scintillationsgefäß (20 ml ; Zinsser) mit 10 ml Scintillationslösung (Miniria 20 ; Zinsser) versetzt, 15 sec heftig geschüttelt und bei 8° C im Flüssigkeitsscintillationszähler (Mark II ; Nuclear Chicago) mit der vorgegebenen Verstärkung gemessen. Die Quenchkorrektur erfolgte über die Methode des Externen Standard Channels Ratio (ESCR), wobei für jedes Nuklid eine Quenchreihe (Amersham Buchler) mit bekannter Aktivität zur Eichung verwendet wurde. Da

die Aktivität der einzelnen Proben nur gering über dem Background lag, wurde jede Probe 100 min lang gezählt und der Backgroundwert des Puffers subtrahiert. Die Proben waren nicht älter als 24 h (Johansson und Lundquist 1972). Die Zähleffektivität lag bei den DNA Proben für H-3 bei 34 % und bei C-14 bei 89 %.

DNA aus Zellen: Für die genaue Bestimmung der Radioaktivität wurde 1 ml Probe mit 10 ml Scintillationslösung (Miniria 20, Zinsser) versetzt, geschüttelt und im Scintillationszähler (Beckman, LS 8000) bei vorgegebener Verstärkung gemessen. Die Quenchkorrektur erfolgte automatisch über die H-Zahl. Die Zähleffektivität lag bei den DNA Proben für H-3 bei 35 % und für C-14 bei 92%.

Für Routinemessungen wurden 100 µl Proben mit 3 ml Scintillationslösung in einem Minivial (5 ml, Zinsser) gezählt.

## 2.4. Enzymatische Verdauung der DNA und Trennung im HPLC

### 2.4.1. Ausfällen der DNA

Die in 0.5 M Na-Phosphat gelöste DNA kann direkt ausgefällt werden (Geck und Nasz 1983). Zu der DNA in 0.5 M Na-Phosphat wurden 10 % (v/v) 0.5 M EDTA-Tris, pH 6.0 und 1 % (v/v) Cetylpyridinium Bromide (10 % (w/v)) zugegeben. Die Mischung wurde geschüttelt und 30 - 40 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gehalten. Nach dem Auftauen wurde das Präzipitat abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min; Minifuge) und das Pellet in Aqua Bidest resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit Ethanol-NaAc Puffer (80 % Ethanol, 20 % (v/v) 0.1 M Na-Acetat, pH 4.5) resuspendiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt und nach Verdampfen des Alkoholgemisches die DNA mit Tris-EDTA (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.2) aufgenommen und eine DNA-Konzentration von 500 µg/ml eingestellt.

#### 2.4.2. Enzymatische Verdauung der DNA

Die enzymatische Verdauung der DNA wurde nach der von Kuo et al. (1980) beschriebenen Methode durchgeführt:

50 µg DNA, gelöst in 100 µl Tris-EDTA Puffer, wurden mit DNase I (E.C. 3.1.21.1, 1559 U/mg ; Worthington) auf 40 µg/ml und mit  $MgCl_2$  auf 4 mM eingestellt und 18 h bei 37° C inkubiert.

Danach erfolgte die Zugabe von 2 Volumenteilen Na-Acetat (30 mM, pH 5.2),  $ZnSO_4$  zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml und Nuclease P 1 (E.C. 3.1.30.1 ; Phosphodiesterase-Aktivität 300 U/mg und 3'-Phosphomonoesterase-Aktivität 1000 U/mg ; Boehringer-Mannheim) zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml. Nach 7 h Inkubation bei 37° C wurde alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1, 2500 U/mg, Kälberdarm ; Boehringer-Mannheim) zu einer Endkonzentration von 85 µg/ml zugegeben, der Reaktionsansatz für weitere 16 h bei 37° C inkubiert und anschließend bis zur Analyse eingefroren.

#### 2.4.3. Präparative Trennung der Nukleoside mit HPLC

Die analytische Trennung des Nukleosidgemisches erfolgte isokratisch mit 5 % Methanol und 95 % Na-Phosphat (0.05 M, pH 7.0, gemischt mit einem HPLC-Controller 2152 ; LKB) über eine RP 18 Säule (250 x 4 mm, Lichrosorb RP 18, 10 µm; Merck), Säulentemperatur 45° C (Säulenofen 2155 ; LKB), Injektionsvolumen 10 µl, Fluß 2 ml/min (HPLC Pumpe 2150 ; LKB), Detektion des Eluats bei 260 nm, 0.32 AUFS (Wavelength Monitor 2152 ; LKB).

Die präparative Trennung der Nukleoside erfolgte unter gleichen Bedingungen bei einem Fluß von 1 ml/min und einem Injektionsvolumen von 100 µl. Die verschiedenen Nukleoside wurden per Hand fraktioniert.

Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde durch das Spektrum (220 - 330 nm, Gilford 250) und durch analytische HPLC Trennung mit einem Fluß von 2 ml/min und 0.04 AUFS (sonst identische Bedingungen) untersucht. Über den Extinktionskoeffizienten (Fasman 1975) kann aus den spektralen Daten und dem Volumen der Nukleosidgehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt werden.

## 2.5. Autoradiographie

**Fixieren der Zellen:** 2 - 3 Tropfen der Zellsuspension wurden in 0.4 ml Methanol fixiert und auf gereinigte Objektträger (Chromschwefelsäurebad, gespült mit Aqua bidest) aufgetragen, ausgestrichen und luftgetrocknet.

**Dehydratisieren:** Nach dem Waschen der Objektträger in Aqua bidest erfolgte die Dehydratisierung in einer Alkoholreihe je 5 min (2 x 70 % Ethanol, 2 x 80 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 2 x Isopropanol und 2 x Xylol).

**Dippen:** Das Dippen wurde in der Dunkelkammer unter Schutzlicht durchgeführt. Nach dem Lösen der Emulsion (K5 Ilford) in 30 ml Aqua bidest und Erwärmung auf 40° C, wurde die Emulsion in das Dippgefäß gegossen, die Objektträger gedippt und senkrecht getrocknet. Die Objektträger wurden nach dem Trocknen in mit Trockengel versehene Clay Adams Boxen (Jürgens) gestellt und die Boxen in Alufolie eingewickelt bei 4° C exponiert. Die Expositionszeit betrug 4 - 8 Wochen.

**Entwicklung:** Die Autoradiogramme wurden bei 17° C (Wasserbad) in frisch angesetzttem Entwickler (D-19 Kodak) unter ständiger Bewegung 6.5 min entwickelt, mit Aqua bidest gespült und 10 min unter Bewegung bei Raumtemperatur fixiert (Express Fixier Salz) und anschließend 20 min mit kaltem Leitungswasser gespült.

**Färbung:** Direkt nach dem Wässern wurden die Zellen in Kern-echtrot (1 g Kernechtrot/l in 5 % (w/v) Aluminiumsulfat) 30 sec gefärbt, in Aqua bidest gespült, dehydratisiert und mit DePeX (Sigma) eingedeckelt.

**Auswertung:** Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (Ortholux II ;Leitz) bei 1000 facher Vergrößerung (Oelimmersion). Pro Ansatz wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet.

## 2.6. Nachweis der Schädigung von Zellen beim Ablösen

### 2.6.1. Ablösen der Zellen mit verschiedenen proteolytischen Enzymen

Konfluente BHK 21 Zellen wurden dreimal mit PBS Puffer gewaschen und mit verschiedenen proteolytischen Enzymen, wie in Kap. 2.1.2. beschrieben, wie folgt abgelöst: 2.5 mg/ml crude Trypsin (E.C. 3.4.21.4, 1 : 250, 0.002 % EDTA ; Boehringer-Mannheim), 50 µg/ml kristallines Trypsin (kristallines Trypsin, Schwein ; Novo), 7.5 mg/ml Kollagenase (E.C. 3.4.24.3, 200 U/mg ; Worthington), Dispase (E.C. 3.4.34.4, Grad II, 2.4 U/ml: Boehringer-Mannheim) und 50 µg/ml Pronase E (Streptomyces griseus, ca. 8 DMC-U/mg; Serva). Alle Enzyme waren in PBS Puffer gelöst, mit Ausnahme von Dispase, die in Pucks Salzlösung A gelöst war.

### 2.6.2. Überleben der Zellen in den verschiedenen Enzymlösungen

Das Ablösen der Zellen erfolgte wie in Kap. 2.1.2. beschrieben, aber die Enzymlösung wurde nicht entfernt, sondern die Inkubation der Zellen bei 37° C fand zusammen mit der Enzymlösung statt. Nach dem Ablösen wurden die Zellen zusammen mit der Enzymlösung in ein Reagenzglas überführt und weiter bei 37° C inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl und des Anteils der mit Trypanblau anfärbbaren Zellen erfolgte zu unterschiedlichen Zeiten.

### 2.6.3. Trypanblautest

Durch die Aufnahme von Trypanblau kann die Zellpermeabilität bestimmt werden. 100 µl der Zellsuspension wurden zu 200 µl Trypanblaulösung (0.5 % (w/v) Trypanblau ; Fluka) in 0.9 % NaCl-Lösung und 200 µl PBS Puffer gegeben und die angefärbten Zellen nach 4 min in einer Neubauer Kammer ausgezählt.

#### 2.6.4. Bestimmung des Anteils der lysierten Zellen

##### 2.6.4.1. Desoxy-H-3-glucose Freisetzung während der Zentrifugation

Nach dem Mediumwechsel wurden konfluente BHK 21 Zellen in Wachstumsmedium mit 1.25 KBq/ml (0.25  $\mu$ Ci/ml) 2-Deoxy-D-[2,6-H-3]glucose für 20 h bei 37° C inkubiert. Nach Entfernung des Mediums und mehrmaligem Waschen der Zellen (normalerweise 4 x) mit PBS Puffer bis keine Radioaktivität in der Waschlösung feststellbar war, wurden die Zellen mit den verschiedenen Enzymen abgelöst (Kap. 2.6.1.), in 3 ml PBS Puffer aufgenommen, und die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Proben aufgeteilt: 1 ml wurde zur Isolierung der DNA verwendet (Kap. 2.3.1.) und die restlichen Zellen in drei Zentrifugationsschritten gewaschen (100 x g, 10 min). Die Überstände der einzelnen Zentrifugationsschritte wurden gesammelt und nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 5 ml PBS Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte durch Ultraschall und die Bestimmung der Radioaktivität durch Flüssigkeitsscintillation. Die während der Zentrifugation freigesetzte Desoxy-H-3-glucose kann als Maß für geschädigte Zellen genommen werden. Während der Zentrifugation war kein signifikanter Zellverlust zu beobachten.

##### 2.6.4.2. Bestimmung der G 6-PDH Aktivität

Die Zellen wurden wie unter 2.6.4.1. beschrieben zentrifugiert; und die Glucose 6-PhosphatDeHydrogenase (G 6-PDH) Aktivität wurde im Überstand und im homogenisierten Zellpellet bestimmt (Boehringer 1977).

#### 2.6.5. Kernisolierung

##### 2.6.5.1. Citrat-Methode modifiziert nach Higashi et al. (1966)

Konfluente BHK 21 Zellen wurden abgelöst und in Zitronensäure (2.5 %) aufgenommen und in einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit einem Teflon-Pistil homogenisiert. Alle weiteren Arbeiten fanden bei 4° C statt. Nach der Trennung der Zellkerne vom Zelldebris durch Zentrifugation (600 x g, 10 min) und Resuspendierung in 5 ml 0.025 M Sucrose in 1.5 % (w/v) Zitronensäure, wurde die Kernsuspension zur weiteren Reinigung auf ein Sucrose-Kissen (5 ml 0.88 M Sucrose in 1.5 % Zitronensäure) geschichtet und zentrifugiert (900 x g, 10 min). Das Kern-Pellet wurde in 0.5 ml 0.25 M Sucrose in 45 % Zitronensäure resuspendiert, in einer Neubauer Zählkammer gezählt, und nach Zugabe von 2.5 ml Homogenisierungspuffer erfolgte die DNA-Isolierung (Kap. 2.3.1).

##### 2.6.5.2. Percoll Methode modifiziert nach Nothacker und Hildebrandt (1984)

Konfluente BHK 21 Zellen wurden abgelöst und in Kern-Puffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM PIPES, 5 mM EGTA, 0.5 M 2-Methylpentan-2,4 diol, 0.8 % Surfyrol 61 (Serva), pH 7.5) resuspendiert und wie in Kap.2.6.5.1. beschrieben homogenisiert. Das Homogenat wurde mit einer Percoll-Lösung gemischt: 9 Vol. Teile Percoll (1.128 g/ml; Pharmacia), 1 Vol. Teil 10 x Kern-Puffer und 15.6 Vol. Teile Kern-Puffer mit dem Homogenat. Nach Zentrifugation (25 Krpm, 30 min, TI 50 Rotor, 20° C, Beckman L5-65) bilden die Kerne im Gradienten eine scharfe Bande. Die Kerne wurden geerntet, in Kern-Puffer resuspendiert, gezählt und die DNA wie beschrieben isoliert (Kap. 2.3.1.).

## 2.7. DNA-Aufnahme und DNA-Austausch

### 2.7.1. DNA-Aufnahme

BHK 21 Zellen wurden während des exponentiellen Wachstums mit 3.7 KBq/ml H-3Thd im Wachstumsmedium markiert. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wurde die DNA extrahiert und ausgefällt (Kap. 2.3.2.) ( $SA\ 9.2 \cdot 10^6$  Bq/mol), in 2 ml SSC Puffer gelöst und dem Wachstumsmedium (5 ml) von konfluenten Zellen zugegeben (2 x 0.7 µg/ml, 2 x 2.1 µg/ml und 1 x 7 µg/ml). Nach 20 h Inkubation bei 37° C wurden die Zellen trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Einige Zellen wurden fixiert und zur Autoradiographie weiterverwendet, die restlichen Zellen homogenisiert und die DNA wie in Kap. 2.2.1. beschrieben isoliert.

### 2.7.2. DNA-Austausch

BHK 21 Zellen wuchsen während des exponentiellen Wachstums in mit 3.7 KBq/ml H-3dThd versetztem Wachstumsmedium. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wurden die Zellen trypsiniert und mit nicht radioaktiv markierten BHK 21 Zellen im Verhältnis (1 + 1, 1 + 3 und 2 + 1) gemischt, in Kulturflaschen überführt und für 24 h bei 37° C inkubiert. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen gezählt und einige Zellen fixiert und zur Autoradiographie verwendet. Die restlichen Zellen wurden homogenisiert und die DNA isoliert (Kap. 2.2.1.).

## 2.8. Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA

### 2.8.1. Bei Mäusen

Die Tierhaltung ist in Kap. 2.2. beschrieben. Nach 2, 4, 16, 32,

114, 116, 120, 128, 144, 207, 310 und 333 Tagen wurden jeweils 3 männliche und 3 weibliche Tiere der mit HTO und C-14 Glucose exponierten Gruppe durch Genickschlag getötet und Milz, Pankreas und Muskel ( M. quadriceps femoralis, links) entnommen und auf Trockeneis gelegt. Die mit H-3 Glucose exponierten Tiere wurden nur bis zum Tag 32 untersucht. Die Gewebe wurden entweder bei  $-23^{\circ}\text{C}$  oder  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, oder sofort homogenisiert. Das durch Punktieren des Herzens gewonnene Blut wurde in einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert und das Blutplasma abgenommen.

### 2.8.2. Bei Zellkulturen

Direkt nach dem Einimpfen (BHK 21), bzw. 20 h nach dem Einimpfen (V79 Zellen), erfolgte die Zugabe der radioaktiven Substanzen zum Wachstumsmedium. In Tab. 2.1. sind die eingesetzten radioaktiven Substanzen und Konzentrationen aufgeführt (alle Amersham Buchler).

Nach Erreichen des konfluenten Stadiums (ca. 3 - 4 Tage) wurden die Zellen mit PBS Puffer zweimal gewaschen, trypsiniert und die DNA isoliert (Kap. 2.3.1.). Bei der Bestimmung der Einbaugeschwindigkeit wurde nach 12, 24, 48, 72, 120 und 144 h jeweils 3 Proben untersucht.

### 2.9. Bestimmung des DNA-turnovers bei tierischen Zellen

Zur Bestimmung des DNA-turnovers bei tierischen Zellen wurden verschiedene konfluente Zelllinien (BHK 21, CHO und MRC-5) am achten Tag nach dem Einimpfen verwendet.

Bei Zellen, die in normalem Wachstumsmedium gewachsen waren, wurde das Medium gewechselt und frisches mit H-3dThd (370 Bq/ml) supplementiertes Wachstumsmedium mit hoher (10 % oder 20 %) oder geringer Serumkonzentration (0.5 % oder 1 %) zugegeben. Zellen, die in radioaktivem Medium gewachsen waren (H-3dThd, 370 Bq/ml), wurden zweimal mit PBS Puffer gewaschen bevor, die Zugabe von

## Tabella 2.1.

| Substanz                           | Spezifische Aktivität | Eingesetzte Aktivität |            |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| L-[2,3-H-3]aspartate               | 44.4 GBq/mmol         | 3.7 - 37.0 KBq/ml     | Zellkultur |
| D-[1-H-3]glucose                   | 18.5 GBq/mmol         | 18.5 KBq/ml           | Maus       |
| 2-Deoxy-D-[2,6-H-3]glucose         | 1.2 TBq/mmol          | 3.7 - 37.0 KBq/ml     | Zellkultur |
| HTO (tritiated Water)              | 3.3 KBq/mmol          | 1.3 KBq/ml            | Zellkultur |
| [methyl-H-3]thymidine              | 925.0 GBq/mmol        | 160.0 KBq/ml          | Maus       |
| 5-Bromo-2'-Deoxy[1',2'-H-3]Uridine | 925.0 GBq/mmol        | 0.37 - 37.0 MBq/ml    | Zellkultur |
| D-[U-C-14]glucose                  | 114.0 MBq/mmol        | 0.37 - 3.7 KBq/ml     | Zellkulutr |
| [U-C-14]thymidine                  | 2.0 GBq/mmol          | 55.5 - 185.0 KBq/ml   | Zellkultur |
|                                    |                       |                       | Maus       |
|                                    |                       | 3.4 KBq/ml            | Zellkultur |
|                                    |                       | 0.37 - 1.9 KBq/ml     | Zellkultur |
|                                    |                       | 37.0 Bq/ml            | Zellkultur |

Tab. 2.1. Verwendete Radiochemikalien (alle von Amersham Buchler)

frischem, nicht radioaktiv markiertem Wachstumsmedium mit hoher (10 % und 20 %) oder geringer Serumkonzentration (0.5 % oder 1 %) erfolgte.

Zu verschiedenen Zeiten wurden die Zellen trypsiniert (Kap. 2.1.2.), die Zellzahl bestimmt und einige Zellen nach dem Fixieren zur Autoradiographie auf Objektträger aufgetropft (Kap.2.5.) Die restlichen Zellen wurden homogenisiert und nach Isolierung der DNA (Kap. 2.3.1.) die spezifische Aktivität bestimmt. Bei einigen Ansätzen erfolgte ein täglicher Mediumwechsel.

#### 2.9.1. Einsatz von Hemmstoffen bei der Bestimmung des DNA-turnovers

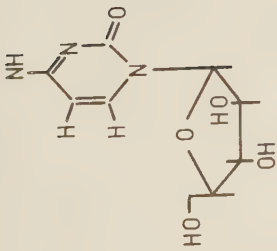
Bei der Bestimmung des DNA-turnovers wurde bei der Beobachtung des Einbaus von H-3Thd in die DNA (Kap. 2.1.6.) die in Tabelle 2.2. aufgeführten Hemmstoffe dem Wachstumsmedium (10 % Serum) zugesetzt.

Zusätzlich wurde der Ausbau von H-3 aus der DNA von Zellen, deren DNA mit H-3Thd markiert war (Kap. 2.9.), in Gegenwart von Hydroxyharnstoff untersucht.

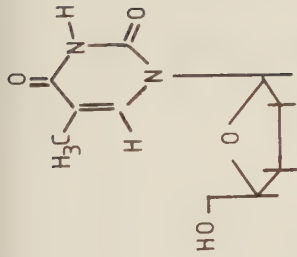
Die Strukturformeln der eingesetzten Hemmstoffe sind in Fig. 2.1. dargestellt.

| Substanz               |               | Eingesetzte Konzentration |
|------------------------|---------------|---------------------------|
| Arabincytosin (AraC)   | Sigma         | 1.0 $\mu$ M               |
| Dideoxythymidine (ddT) | Sigma         | 0.44 mM                   |
| Hydroxyharnstoff (HU)  | Boehringer-M. | 2.0 mM                    |
| Novobiocin             | Sigma         | 0.3 mM                    |

Tab. 2.2. Eingesetzte Hemmstoffe



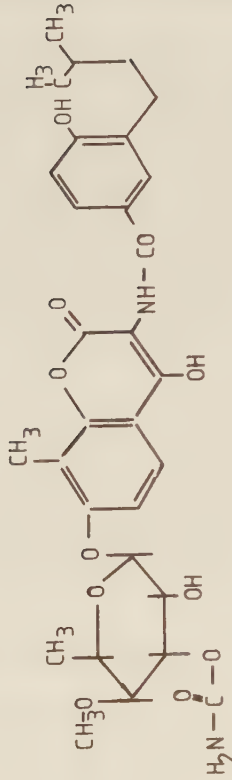
Arabinosylcytosin



2',3' dideoxythymidin



Hydroxyharnstoff



Novobiocin

Fig. 2.1. Eingesetzte Hemmstoffe

### 2.9.2. Inkubation von BHK 21 Zellen mit H-3BrdU

Bei konfluenten BHK 21 Zellen erfolgte am achten Tag nach dem Einimpfen ein Mediumwechsel, bei dem das Medium durch frisches Wachstumsmedium mit (10 % fötalem Kälberserum und 111 KBq/ml 5-Bromo-2' deoxy[1',2'-H-3]uridine ersetzt wurde. Nach 4, bzw. 8 h Inkubation bei 37° C wurden die Zellen trypsiniert, in TEN Puffer aufgenommen und einige Zellen fixiert und zur Autoradiographie weiterverwendet (Kap. 2.5.). Die restlichen Zellen wurden wie bei Kap. 2.3.2. beschrieben lysiert, und nach Extraktion wurde die DNA im CsCl-gradienten getrennt (Kap. 2.3.6.). Bei einem Ansatz fand der Einbau von H-3BrdU über 8 h in Gegenwart von Hydroxyharnstoff (2 mM) statt.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde das H-3BrdU direkt zu dem acht Tage alten Wachstumsmedium zu einer Endkonzentration von 185 KBq/ml zugegeben und nach 4 und 8 h Inkubation bei 37° C wurden die Zellen trypsiniert und wie beschrieben weiter aufgearbeitet.

### 2.9.3. Immobilisierung von BHK 21 Zellen

Trypsinierte BHK 21 Zellen wurden in NaCl-HEPES Puffer (0.125 M NaCl, 0.025 M HEPES (Serva), pH 7.8) resuspendiert und mit 7 % (w/v) Alginat (Manucol, DH; Alginate Industries) im Verhältnis 1 + 1 gemischt. Die Zellkonzentration betrug  $1.5 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Die Zellsuspension wurde tropfenweise mit einer Spritze (Kanülen-durchmesser 0.8 mm) in CaCl<sub>2</sub>-HEPES (0.05 M CaCl<sub>2</sub>, 0.02 M HEPES, pH 7.8) gegeben. Nach 10 min Immobilisierung wurden die Partikel mit NaCl-HEPES Puffer gewaschen und in 10 ml Wachstumsmedium überführt. 20 Partikel wurden in einer Kulturflasche bei 37° C inkubiert und das Medium jeden zweiten Tag gewechselt.

#### 2.9.4. Inkubation der immobilisierten Zellen mit H-3BrdU und BrdU

Die immobilisierten Zellen wurden direkt nach der Immobilisierung, nach 10, 20, und 30 Tagen für 20 h mit 5-Bromo-2'deoxy[1',2'-H-3]uridine (55.5 KBq/ml) bei 37<sup>0</sup> C inkubiert. Am 30. Tag nach der Immobilisierung wurden die Zellen auch mit 6 µg/ml 5-Bromo-2'deoxyuridine (Fluka) inkubiert. Nach dem Auflösen der Partikel in EDTA-HEPES (0.0125 M EDTA, 0.025 M HEPES, pH 7.8) und Bestimmung der Zellzahl, wurden die Zellen durch Zentrifugieren (Minifuge 1000 rpm, 10 min) gewaschen. Danach wurden die Zellen in TEN Puffer resuspendiert und die DNA extrahiert (Kap. 2.3.2.).

Alle andern Reagentien waren von Merck (p.a.) , und es wurde nur doppelt quarzdestilliertes Wasser verwendet

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Methodische Ergebnisse

##### 3.1.1. Vergleich der beiden DNA-Isolierungsmethoden

Die DNA wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden isoliert. Erstens durch Bindung an Hydroxylapatite und selektive Ablösung der doppelsträngigen DNA (Kasche et al. 1981B), zweitens durch Extraktion in Phenol, Chloroform und durch Ausfällen der DNA mit Ethanol (modifiziert nach Marmur 1961), eine Methode, die zur Isolierung hochmolekularer DNA führt. Die erste Methode ermöglicht auch die quantitative Isolierung von geringen DNA-Mengen (1 µg).

In Tabelle 3.1. sind die charakteristischen DNA-Werte für beide Methoden der DNA-Isolierung dargestellt. Mit der DNA-Isolierung kann DNA frei von Proteinen ( $A_{260}/A_{230} > 2.0$ ) und frei von RNA ( $A_{280}/A_{260} \approx 0.5$ ) isoliert werden. Diese hohe Reinheit der DNA wird sowohl durch das Spektrum, wie auch durch den hohen hyperchromatischen Effekt charakterisiert. Ein zusätzlicher Vorteil dieser DNA-Isolierungsmethode ist die hohe Ausbeute (> 95 %) (Kasche et al. 1981B). Der Vorteil der DNA-Extraktion ist, daß das Molekulargewicht der isolierten DNA sehr hoch ist ( $> 2.5 \cdot 10^7$  D). Aus den spektralen Daten zeigt sich aber, daß die auf diese Art und Weise isolierte DNA nicht frei von Proteinen und RNA ist.

|                                    | DNA-<br>Isolierung <sup>1)</sup>                    | DNA-<br>Extraktion <sup>2)</sup>                                                | Bemerkung                          |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> | 2.24                                                | 1.32                                                                            |                                    |
| A <sub>280</sub> /A <sub>260</sub> | 0.48                                                | 1.62                                                                            |                                    |
| Hyperchr.<br>Effekt [%]            | 34.5                                                | 18.8                                                                            |                                    |
| T <sub>m</sub> [°C]                | 86.5 (SSC)<br>98.5 (0.5 M NaPP)                     | 86.5 (SSC)                                                                      |                                    |
| Molekular-<br>gewicht [D]          | 5.1 · 10 <sup>5</sup><br>(~ 850 BP)                 | 2.5 · 10 <sup>7</sup><br>(~ 30 000 BP)                                          |                                    |
| pg DNA<br>pro Zelle                | 9.5 · 10 <sup>-12</sup><br>20.0 · 10 <sup>-12</sup> | 3.4 · 10 <sup>-12</sup> <sup>3)</sup><br>19.9 · 10 <sup>-12</sup> <sup>4)</sup> | (immob. Zellen)<br>(tryps. Zellen) |
| Effektivität <sup>5)</sup><br>[%]  | 95                                                  | 30 - 58 <sup>3)</sup>                                                           |                                    |

1) nach Kasche et al. 1981B

2) modifiziert nach Marmur 1961

3) direkt ausgefällte DNA, bei geringer Zellzahl

4) über Nacht ausgefällte DNA, bei hoher Zellzahl

5) Anteil der H-3 Aktivität der DNA zur H-3 Aktivität in allen  
Fraktionen nach Markierung der DNA mit H-3dThd

Tabelle 3.1. Vergleich der beiden DNA-Isolierungsmethoden.

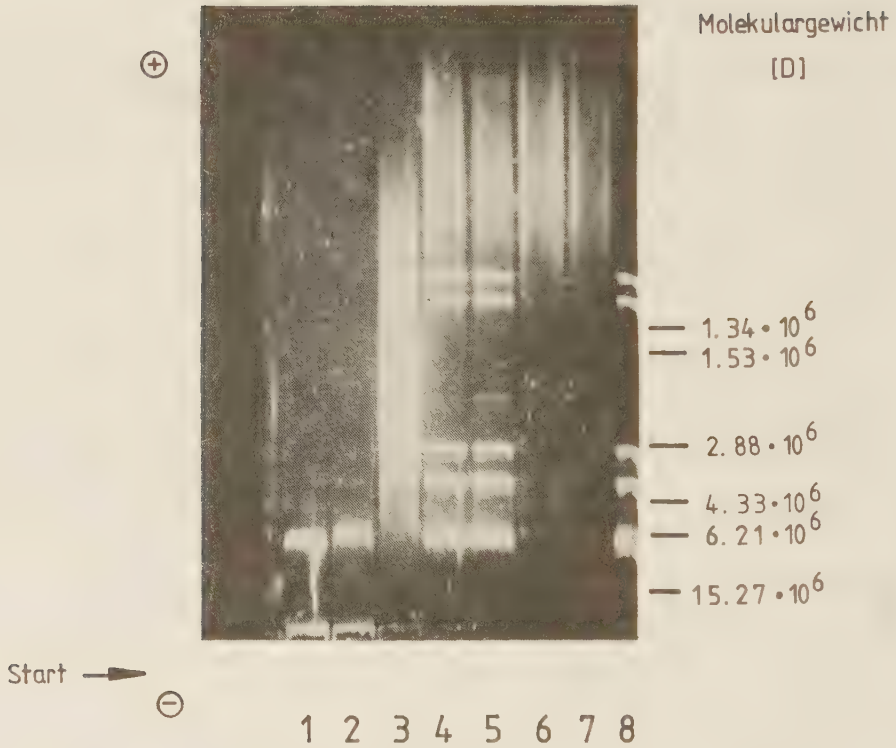


Fig. 3.1. Molekulargewichtsbestimmung der mit den verschiedenen Methoden isolierten DNA von BHK 21 Zellen durch Elektrophorese in einem Agarose-Gel (1%).

Die einzelnen Proben sind:

Nr.

- |   |   |                                                                                                                          |
|---|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | } | mit Phenol, Chloroform extrahierte DNA (Kap. 2.3.2.)                                                                     |
| 2 |   |                                                                                                                          |
| 3 |   | Kalbsthymus DNA                                                                                                          |
| 4 | } | mit Ultraschall homogenisiert und über Hydroxylapatit isolierte DNA und $\lambda$ DNA mit Hind III verdaut (Kap. 2.3.1.) |
| 5 |   |                                                                                                                          |
| 6 | } | mit Ultraschall homogenisiert und über Hydroxylapatite isolierte DNA (Kap. 2.3.1.)                                       |
| 7 |   |                                                                                                                          |
| 8 |   | $\lambda$ DNA mit Hind III verdaut                                                                                       |

### 3.2. Schädigung von Monolayer Zellen während des Ablösens

Bei Untersuchungen an konfluenten Zellen wird zum Nachweis, daß alle Zellen in  $G_1$ -Phase sind, der DNA-Gehalt pro Zelle bestimmt. Bei den einzelnen Experimenten zeigte dieser Wert jedoch starke Schwankungen (15 - 40 pg DNA/Zelle) und war im Vergleich zu Literaturangaben um den Faktor 2 - 4 zu hoch. Die Erklärung, daß dann alle Zellen nach der DNA-Synthese in  $G_2$ -Phase waren, scheint sehr unwahrscheinlich, zumal bei den immobilisierten Zellen, die ohne Enzymbehandlung nur mit EDTA aus der Alginat Matrix herausgelöst wurden, ein DNA-Gehalt von 8 - 10 pg pro Zelle gemessen wurde (Kap. 3.6.). Aus diesem Grunde wurde der Einfluß von Trypsin und anderen proteolytischen Enzymen bei der Ablösung von Monolayer Zellen näher untersucht.

#### 3.2.1. Variation des ermittelten DNA-Gehalts pro Zelle bei Verwendung verschiedener proteolytischer Enzyme zum Ablösen der Zellen

Nach der Trypsinierung von konfluenten BHK 21 Zellen schwankte der ermittelte DNA-Gehalt pro Zelle sehr stark, während der DNA-Gehalt pro Kulturflasche konstant blieb. Da ein möglicher Effekt durch die Trypsinbehandlung nicht auszuschließen war, wurden andere proteolytische Enzyme zum Ablösen der Zellen benutzt und anschließend die DNA quantitativ isoliert.

Die Ergebnisse in Tabelle 3.2.A zeigen, daß bei allen verwendeten Enzymen ('crude' Trypsin, kristallines Trypsin, Pronase E, Dispase und Kollagenase) der DNA-Gehalt pro Kulturflasche konstant ist, während der DNA-Gehalt pro gezählter Zelle stark schwankt und gegenüber dem Literaturwert zu hoch liegt. Der DNA-Gehalt von immobilisierten Zellen, die ohne Enzymbehandlung aus der Alginat Matrix isoliert wurden, und der DNA-Gehalt von isolierten Kernen ist dagegen mit Literaturwerten vergleichbar und liegt bei 8 - 10 pg DNA/Zelle (Nucleus) (Tabelle 3.2.B)

Diese Ergebnisse können folgendermaßen interpretiert werden: Durch die Enzymbehandlung wurde ein Teil der Zellen lysiert oder

geschädigt. Während nur die intakten Zellen gezählt wurden, erfolgte die DNA-Isolierung sowohl von lysierten, als auch von intakten Zellen.

| A. Enzymatische Ablösung von BKK 21 Zellen    |                              |                          |
|-----------------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Verwendetes Enzym                             | $\mu\text{g DNA}$<br>Flasche | $\text{pg DNA}$<br>Zelle |
| Trypsin, 'crude' (500 $\mu\text{g/ml}$ )      | 250                          | 19.8                     |
| Trypsin, kristallin<br>(50 $\mu\text{g/ml}$ ) | 267                          | 20.7                     |
|                                               | 245                          | 20.7                     |
|                                               | 242                          | 28.7                     |
| Kollagenase (7.5 $\text{mg/ml}$ )             | 257                          | 26.4                     |
| Pronase E (50 $\mu\text{g/ml}$ )              | 258                          | 25.4                     |
|                                               | 258                          | 18.9                     |
|                                               | 267                          | 17.6                     |
| Dispase (4.8 $\text{mg/ml}$ )                 | 271                          | 35.3                     |
| B. Nichtenzymatische Behandlung               |                              |                          |
| Immobilisierte Zellen                         |                              | 10.5                     |
| Isolierte Kerne (Percoll)                     |                              | 10.5                     |
| (Citrate)                                     |                              | 7.5                      |
| Menschliche Lymphocyten                       |                              | 6.3                      |

Tabelle 3.2. DNA-Gehalt pro Kulturflasche und ermittelter DNA-Gehalt pro Zelle bei enzymatischer Ablösung von konfluenten BHK 21 Zellen (A) und DNA-Gehalt pro Zelle (Kern) bei nicht enzymatischer Behandlung der Zellen (B).

### 3.2.2. Inkubation von BHK 21 Zellen in der Enzymlösung

Zum Nachweis, ob die verschiedenen Enzyme, die zum Ablösen von BHK 21 Zellen verwendet wurden, die Zellen schädigen, wurden die Zellen nach dem Ablösen in der Enzymlösung inkubiert, und die Zellzahl und der Anteil der mit Trypanblau anfärbbaren Zellen bestimmt. Für die verwendeten Enzyme: 'crude' Trypsin, kristallines Trypsin, Kollagenase, Pronase E und Dispase sind die Ergebnisse in Fig. 3.2. dargestellt. Der Zeitpunkt der Enzymzugabe entspricht  $t = 0$ .

Die für alle verwendeten Enzyme beobachtete konstante Abnahme der Zellzahl kann durch eine irreversible Schädigung der Zellen erklärt werden. Die geringe Abnahme, die bei Kollagenase beobachtet wird ist irreführend, da sich die Zellen bei Kollagenasebehandlung sehr schlecht ablösen ließen. Selbst bei einer relativ hohen Kollagenasekonzentration (7.5 mg/ml) dauerte es lange, bis sich die Zellen durch heftiges Pipettieren ablösen ließen.

Die beobachtete Abnahme der Zellzahl ist nicht alleine auf die proteolytische Aktivität der Enzyme zurückzuführen, da keine Korrelation zwischen der beobachteten Abnahme der Zellzahl und der proteolytischen Aktivität beobachtet werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei Verwendung von Trypsin, sowohl 'crude' als auch kristallin, war direkt nach dem Ablösen ein großer Anteil Zellen (40 %) mit Trypanblau anfärbbar. Bei Verwendung von Pronase E und Dispase war dieser Anteil geringer.

Beim Kontrollansatz (Zellen, die 2 min mit kristallinem Trypsin inkubiert und nach dem Ablösen in PBS Puffer bei 37° C inkubiert wurden) bleibt die Zellzahl während der Inkubation konstant, während der Anteil trypanblaugefärbter Zellen abnahm. Somit kann die bei den anderen Ansätzen beobachtete Abnahme der Zellzahl auf eine Schädigung der Zellen durch die proteolytischen Enzyme zurückgeführt werden.

Die reversible Permeabilisierung der Zellen zeigt, daß nicht alle permeabilisierten Zellen lysieren, und daß permeabilisierte Zellen in der Lage sind, die entstandenen Schäden zu repa-

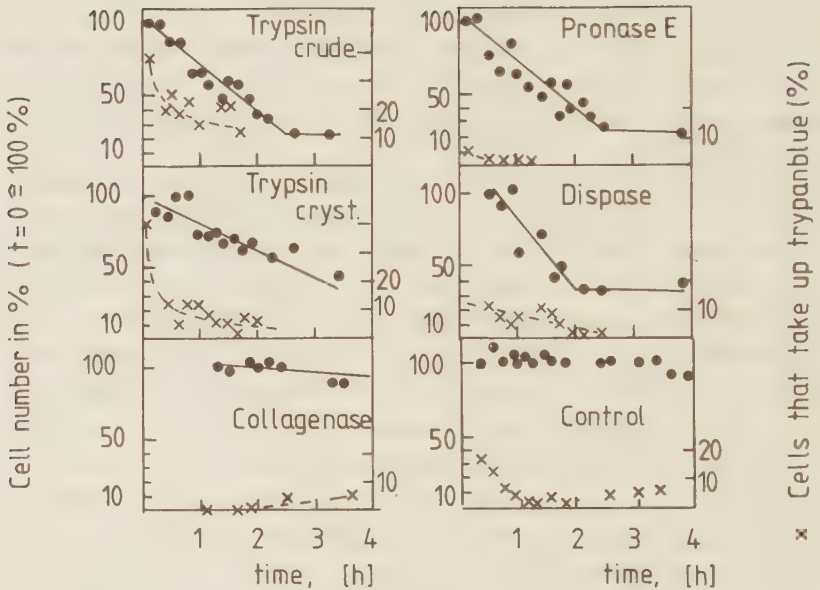


Fig. 3.2. Schädigung von BHK 21 Zellen während der Inkubation in der Enzymlösung, die zum Ablösen der Zellen benutzt wurde.

Konfluente BHK 21 Zellen wurden mit verschiedenen Enzymen, wie unter Material und Methoden beschrieben, abgelöst und in der Enzymlösung bei 37° C in Suspension für 4 h inkubiert. Die Enzymlösung wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  zu den Zellen gegeben, und nach dem Abrunden und Ablösen der Zellen die Zellzahl bestimmt und als 100 % Wert verwendet. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Zellzahl und der Anteil der mit Trypanblau anfärbbaren Zellen bestimmt. Der Kontrollansatz wurde wie folgt behandelt: Nach 2 min Inkubation mit kristallinem Trypsin wurde die Enzymlösung abgekippt und die Zellen bei 37° C bis zum Ablösen inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS Puffer resuspendiert und wie die anderen Ansätze bei 37° C inkubiert.

rieren. Der Anteil permeabilisierter Zellen ist beim Kontrollansatz mit 16 % geringer als nach der Inkubation der Zellen in Trypsin (40 %). Der Unterschied kann durch eine stärkere Schädigung der Zellen durch die längere Inkubationszeit, oder durch tote Zellen, die sich anfärbten und mitgezählt wurden, erklärt werden.

Während der Inkubation in der Enzymlösung konnte im Lichtmikroskop eine Veränderung der Zellen beobachtet werden. Direkt nach dem Ablösen waren die meisten Zellen rund und hatten eine glatte Oberfläche. Ein Teil der in der Enzymlösung inkubierten Zellen bildete Bläschen und die gesamte Zelle erhielt eine brombeerartige Struktur (Figur 3.3.A). Danach verloren die Zellen ihre runde Oberfläche (Figur 3.3.B), was vermutlich das letzte Stadium vor der Zellyse war.

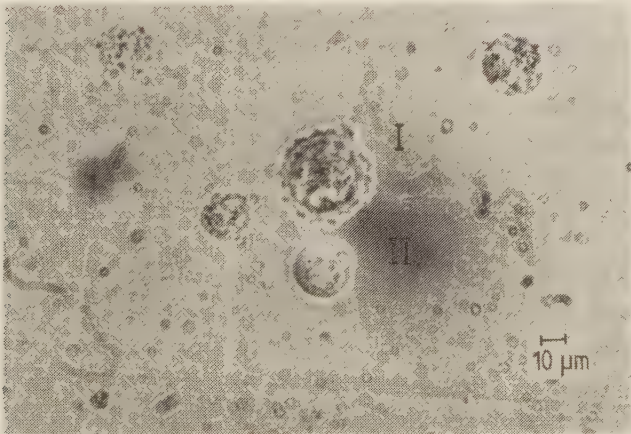


Fig. 3.3.A. Struktur einer BHK 21 Zelle nach 2.5 h Inkubation in Trypsinlösung bei 37° C (I). Die Plasmamembran hat Bläschen ausgebildet und ist nicht mehr rund wie bei ungeschädigten Zellen (II). (Vergrößerung 450 x).



Fig. 3.3.B Struktur einer BHK 21 Zelle vor der Lyse. Die Zelle wurde in Pronase E für 3.5 h inkubiert und hat ihre runde Form verloren, was vermutlich das letzte Stadium vor der Zellyse ist. In diesem Zustand sind die Zellen gegenüber mechanischen Kräften sehr empfindlich und können z.B. durch Pipettieren zerstört werden. (Vergrößerung 450 x).

### 3.2.3. Bestimmung des Anteils an geschädigten Zellen

Die ungeschädigten Zellen können nicht einfach von der DNA, die von den lysierten Zellen freigesetzt wird, durch Zentrifugation getrennt werden. Die freigesetzte DNA ist hochmolekular und bildet eine viskose Matrix, in die intakte Zellen eingeschlossen werden. Bei der Zentrifugation sedimentiert die DNA zusammen mit den Zellen. Diese DNA-Matrix konnte auch nicht durch DNase I aufgelöst werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Um die Anzahl der geschädigten Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit der DNA-Matrix in 3 Zentrifugationsschritten gewaschen und die Aktivität von Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase (G 6-PDH), bzw. das Auftreten von Desoxy-H-3-glucose, in den gesamten Überständen bestimmt.

### 3.2.3.1. G 6-PDH Aktivität in den Überständen

Zur Bestimmung des Anteils lysierter und geschädigter Zellen wurden konfluente BHK 21 Zellen mit verschiedenen Enzymen abgelöst und durch drei Zentrifugationsschritte gewaschen. Die Verteilung der G 6-PDH Aktivität in den Überständen ist in Fig. 3.4. dargestellt. Nur ein geringer Anteil der G 6-PDH Aktivität war im Überstand, weshalb die G 6-PDH Aktivität nicht als ein Maß für die beobachtete Zellyse verwendet werden kann. Es kann angenommen werden, daß die hochmolekulare G 6-PDH (MG 130 000) in die Bläschen der lysierten Zellen eingeschlossen wird und dadurch keine Aktivität meßbar ist (Kap. 4.1.).

G 6-PDH Activity in % of total activity

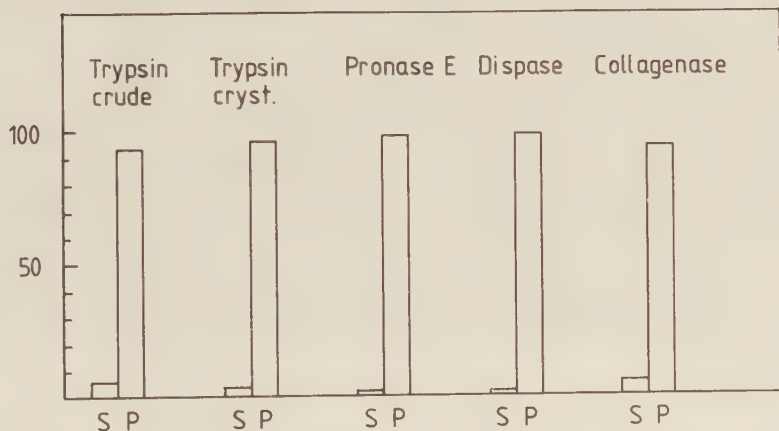


Fig. 3.4. Freisetzung von Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase (G 6-PDH)  
Konfluente BHK 21 Zellen wurden dreimal mit PBS Puffer gewaschen und mit folgenden Enzymen abgelöst: 'crude' Trypsin, kristallines Trypsin, Pronase E, Dispase und Kollagenase. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml PBS Puffer resuspendiert, 2 ml Zellsuspension in 3 Zentrifugationsschritten gewaschen (100 x g, 10 min) und die G 6-PDH Aktivität in den gesamten Überständen (S) und im letzten Zellpellet (P) nach Homogenisierung bestimmt. Während der Zentrifugation war keine signifikante Abnahme der Zellzahl zu beobachten.

### 3.2.3.2. Bestimmung der Desoxy-H-3-glucose Aktivität in den Überständen

Da die hochmolekulare G 6-PDH vermutlich in den Bläschen eingeschlossen wird und deshalb im Überstand kaum G 6-PDH Aktivität gemessen werden kann, wurde die Aktivität der niedermolekularen Desoxy-H-3-glucose im Überstand bestimmt. Desoxy-glucose wird von den Zellen in normalem Umfang aufgenommen und phosphoryliert. Da Desoxy-glucose-6-Phosphat nicht weiter metabolisiert werden kann, wird es in der Zelle angereichert.

Konfluente BHK 21 Zellen erhielten 1.25 KBq/ml (0.25  $\mu$ Ci/ml) Desoxy-H-3-glucose zu ihrem Wachstumsmedium. Nach 20 h Inkubation wurden die Zellen mit 'crude' Trypsin, kristallinem Trypsin, Pronase E und Dispase abgelöst und die Desoxy-H-3-glucose Aktivität im Zellpellet (nach drei Zentrifugationsschritten) und im gesamten Überstand bestimmt.

Die Ergebnisse in Figur 3.5. zeigen, daß bei Verwendung von Trypsin etwa 40 % der Desoxy-H-3-glucose Aktivität im Überstand gemessen wurde. Dies zeigt, daß etwa 40 % der Zellen durch die Enzymbehandlung lysiert oder permeabilisiert wurden. Bei Pronase E und Dispase sind sogar 68, bzw. 63 % der Zellen geschädigt. Während der Zentrifugation wurde keine Abnahme der Zellzahl beobachtet, so daß eine durch die Zentrifugation bedingte Zellschädigung und Freisetzung der Desoxy-H-3-glucose ausgeschlossen werden kann.

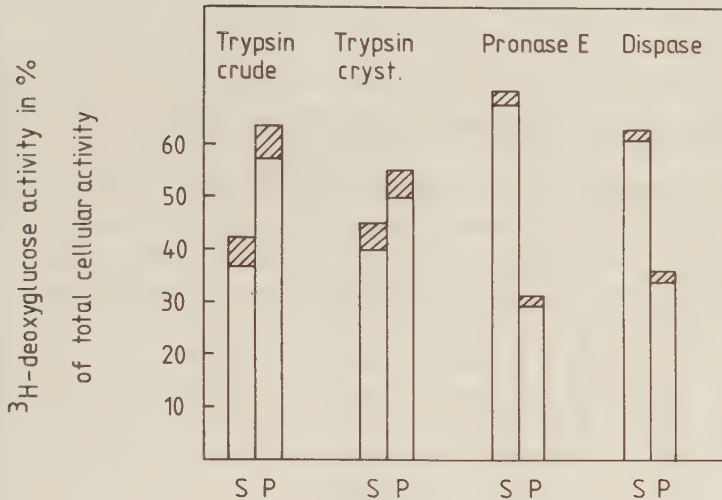


Fig. 3.5. Freisetzung von Desoxy-H-3-glucose während der Zentrifugation von BHK 21 Zellen  
 Konfluente BHK 21 Zellen wurden für 20 h mit 10 ml Wachstumsmedium mit 1.25 KBq/ml 2-desoxy-D-[2,6-H-3]-glucose inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen viermal mit PBS Puffer gewaschen und mit folgenden Enzymen abgelöst: 'crude' Trypsin, kristallines Trypsin, Pronase E und Dispase. Nach Resuspendieren der Zellen in 3 ml PBS Puffer wurden 2 ml der Zellsuspension in drei Zentrifugationsschritten (100 x g, 10 min) getrennt. Die Radioaktivitätsmessung der Desoxy-H-3-glucose erfolgte von den gesamten Überständen (S) und vom letzten Zellpellet (P) nach Homogenisation. Die gestrichelten Linien geben die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Messungen an. Während der Zentrifugation wurde keine signifikante Abnahme der Zellzahl beobachtet.

#### 3.2.4. Bestimmung des DNA-Gehaltes pro Zelle

Da die lysierten und geschädigten Zellen DNA und Desoxy-H-3-Glucose freisetzen wurde der Anteil von Desoxy-H-3-glucose in den Überständen bestimmt, als Index für geschädigte Zellen betrachtet und als Korrekturfaktor für die Bestimmung des DNA-Gehaltes pro Zelle verwendet. Beides, der DNA-Gehalt pro gezählter Zelle und der um den Anteil an Desoxy-H-3-glucose im Überstand korrigierte Wert sind für die verwendeten Enzyme in Tab. 3.3. aufgeführt. Der DNA-Gehalt pro gezählter Zelle schwankt sehr stark, aber nach Korrektur ist der DNA-Gehalt pro Zelle bei 10 pg, zeigt nur noch geringe Variation und ist mit Literaturwerten vergleichbar.

| Enzym                  | pg DNA<br>Zelle | Korrektur<br>Faktor | pg DNA<br>Zelle;<br>korrigiert | Korrigierter<br>DNA Gehalt<br>(Mittelwert)<br>(pg/Zelle) |
|------------------------|-----------------|---------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Trypsin,<br>'crude'    | 26.4            | 0.56                | 11.2                           | 9.8 + 1.5                                                |
|                        | 23.2            | 0.57                | 10.0                           |                                                          |
|                        | 12.1            | 0.37                | 7.6                            |                                                          |
|                        | 16.9            | 0.34                | 11.1                           |                                                          |
|                        | 17.2            | 0.47                | 9.1                            |                                                          |
| Trypsin,<br>kristallin | 28.4            | 0.53                | 13.3                           | 10.7 + 1.9                                               |
|                        | 15.4            | 0.42                | 8.8                            |                                                          |
|                        | 18.4            | 0.51                | 9.4                            |                                                          |
|                        | 18.6            | 0.41                | 11.0                           |                                                          |
| Pronase E              | 26.1            | 0.65                | 9.1                            | 9.2 + 1.2                                                |
|                        | 23.6            | 0.66                | 8.0                            |                                                          |
|                        | 27.4            | 0.62                | 10.4                           |                                                          |
| Dispase                | 24.7            | 0.54                | 11.4                           | 11.3 + 0.7                                               |
|                        | 35.4            | 0.66                | 12.0                           |                                                          |
|                        | 39.8            | 0.70                | 11.6                           |                                                          |
|                        | 34.3            | 0.70                | 10.3                           |                                                          |
|                        |                 |                     |                                | 10.3 + 1.5                                               |

Tab.3.3. Unkorrigierter und korrigierter DNA-Gehalt für BHK 21 Zellen. Die Zellen wurden mit den Enzymen abgelöst, und der während drei Zentrifugationsschritten freigesetzte Anteil von Desoxy-H-3-glucose wurde als Maß für geschädigte Zellen verwendet, und der berechnete DNA-Gehalt pro Zelle um diesen Wert korrigiert. Die so berechneten Werte des DNA-Gehalts zeigen nur eine geringe Streuung und stimmen mit Literaturwerten überein.

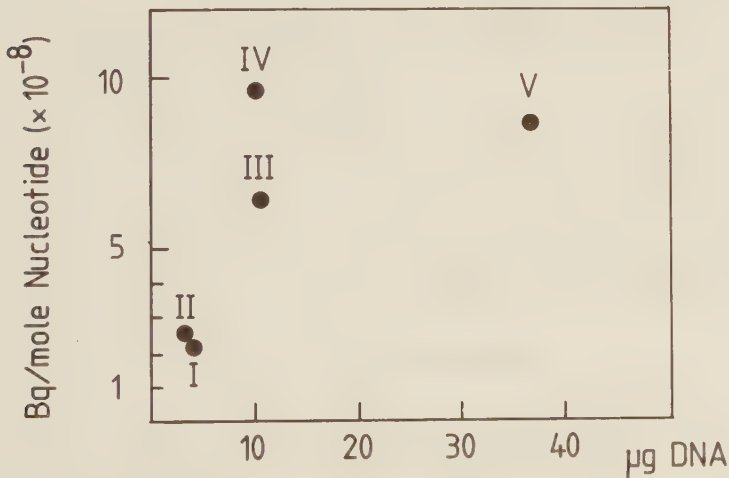
### 3.3. DNA-Aufnahme und DNA-Austausch bei BHK 21 Zellen

Durch die enzymatische Behandlung der Zellen wird ein großer Teil der Zellen lysiert und ihre DNA wird freigesetzt (Kap. 3.2). Die freigesetzte DNA könnte von den unlysierten Zellen aufgenommen und stabil in das Genom integriert werden. Deshalb wurde die Aufnahme exogener DNA aus dem Wachstumsmedium und der DNA-Austausch zwischen markierten und unmarkierten Zellen untersucht.

### 3.3.1. DNA-Aufnahme aus dem Medium

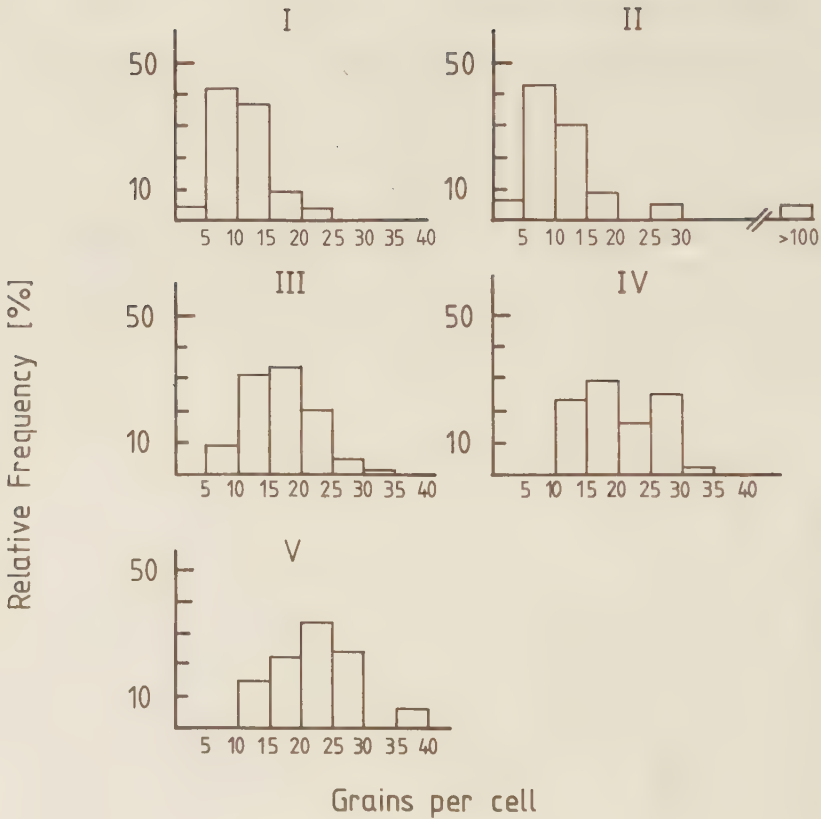
Radioaktiv markierte DNA wurde in unterschiedlichen Konzentration dem Wachstumsmedium zugegeben und nach 20 h Inkubation wurde die spezifische Aktivität der zellulären DNA (Fig. 3.6.) bestimmt und Autoradiogramme der markierten Zellen erstellt (Fig. 3.7.).

Die spezifische Aktivität der isolierten zellulären DNA zeigt den Einbau der exogen applizierten DNA in die Zellen. Der Einbau weist bei hoher DNA-Konzentration eine Sättigung auf (Fig.3.6.). Die Autoradiogramme (Fig. 3.7.) zeigen, daß alle Zellen markiert sind und daß die Silberkorndichte mit der spezifischen Aktivität der isolierten zellulären DNA korreliert.



Figur 3.6. DNA-Aufnahme aus dem Medium: Spezifische Aktivität der zellulären DNA.

Radioaktiv markierte DNA wurde in folgenden Konzentrationen dem Wachstumsmedium von konfluenten BHK 21 Zellen zugesetzt: 3.5  $\mu\text{g/5ml}$  (I,II), 10.5  $\mu\text{g/5ml}$  (III, IV) und 35  $\mu\text{g/5ml}$  (V). Nach 20 h Inkubation wurden die Zellen tryptiniert, die spezifische Aktivität der DNA bestimmt, und von einigen Zellen wurde Autoradiogramme erstellt (Fig. 3.7.)



Figur 3.7. DNA-Aufnahme aus dem Medium: Häufigkeitsverteilung der Silberkörner pro Zelle. Radioaktiv markierte DNA wurde in folgenden Konzentrationen dem Wachstumsmedium von konfluenten BHK 21 Zellen zugesetzt: 3.5  $\mu\text{g}/5\text{ml}$  (I,II), 10.5  $\mu\text{g}/5\text{ml}$  (III, IV) und 35  $\mu\text{g}/5\text{ml}$  (V). Nach 20 h Inkubation wurden die Zellen trypsiniert, von einigen Zellen wurden Autoradiogramme erstellt und die spezifische Aktivität der zellulären DNA wurde bestimmt (Fig. 3.6.)

### 3.3.2. DNA-Austausch zwischen Zellen

BHK 21 Zellen, die in Wachstumsmedium ohne bzw. mit H-3dThd bis zur Konfluenz gewachsen waren, wurden trypsiniert, in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und im Verhältnis 1 + 1, 3 + 1 und 1 + 2 gemischt. Nach 24 h Inkubation bei 37° C wurden die Zellen trypsiniert, die DNA der Zellen isoliert und ein Teil der Zellen zur Autoradiographie verwendet.

Tabelle 3.4. zeigt die gemessene spezifische Aktivität der zellulären DNA nach 24 h Inkubation. Der Unterschied zwischen der gemessenen spezifischen Aktivität der zellulären DNA und der spezifischen Aktivität der eingesetzten DNA ist auf Zellyse während des Ablösens der Zellen zurückzuführen. Deshalb ist unklar, ob die beobachtete Markierung der nicht vormarkierten Zellen auf DNA-Aufnahme aus dem Medium oder auf DNA-Austausch zwischen benachbarten Zellen zurückzuführen ist.

Bei den ersten beiden Ansätzen wurde ca.  $15 \cdot 10^7$  Zellen eingesetzt, das entspricht der Zellzahl in konfluentem Stadium. Da durch die Trypsinbehandlung Zellen lysiert werden, ist nach dem Anheften der Zellen kein konfluenter Zustand erreicht. Bei allen Ansätzen waren noch freie Stelle auf der Wachstumsoberfläche zu erkennen, und somit muß berücksichtigt werden, daß sich ein Teil der Zellen noch teilt, und sich die Radioaktivität der vormarkierten Zellen nach der Inkubation halbiert.

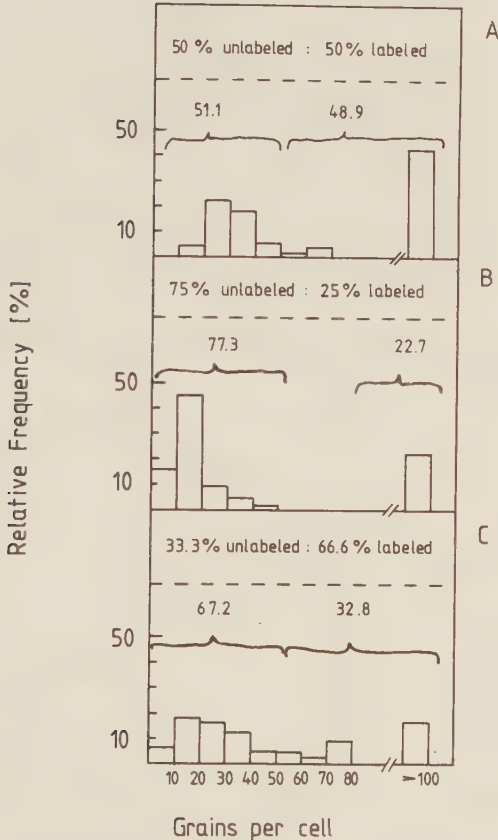
Der Anteil der Zellen, die replikative DNA-Synthese durchführen, wurde bei der Auswertung der Autoradiogramme berücksichtigt. Die markierten Zellen (> 100 Silberkörner pro Zelle) lassen sich deutlich von den schwach markierten Zellen unterscheiden. Da sich ein Teil der vormarkierten Zellen geteilt hat, führt das zu einer geringeren Silberkornzahl. Es wird angenommen, daß Zellen mit mehr als 50 geschwärzten Silberkörnern die Nachkommen der vormarkierten Zellen sind, während die Zellen mit weniger als 50 Silberkörner die Zellen sind, die DNA aufgenommen haben. Figur 3.8. A, und B zeigen, bei Berücksichtigung der Zellteilung bei vormarkierten Zellen, daß sich die vormarkierten Zellen von nicht vormarkierten Zellen im Autoradiogramm unterscheiden lassen.

In Figur 3.8.C können die vormarkierten Zellen nicht mehr von den

| Mischungsverhältnis<br>nicht markiert : markiert | ml<br>eingeeimpft | SA <sub>i</sub> isoliert<br>[Bq/mol Nukleotid] | SA <sub>e</sub> eingesetzt<br>[Bq/mol Nukleotid] | $\frac{SA_{i\text{ isoliert}}}{SA_{e\text{ eingesetzt}}}$ |
|--------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1 + 1                                            | 10                | $1.7 \cdot 10^{10}$                            | $2.4 \cdot 10^{10}$                              | 0.71                                                      |
| 3 + 1                                            | 10                | $0.3 \cdot 10^{10}$                            | $1.2 \cdot 10^{10}$                              | 0.27                                                      |
| 1 + 2                                            | 7.5               | $0.6 \cdot 10^{10}$                            | $3.2 \cdot 10^{10}$                              | 0.19                                                      |
| Markierte Zellen<br>vor dem Mischen              |                   | $4.8 \cdot 10^{10}$                            |                                                  |                                                           |

Tabelle 3.4. DNA-Austausch zwischen BHK 21 Zellen: Vergleich der spezifische Aktivität der eingesetzten und der isolierten DNA.  
Trypsinierte , nicht markierte und radioaktiv markierte BHK 21 Zellen wurden gemischt und nach 24 h Inkubation bei 37° C wurden die Zellen trypsinisiert, die spezifische Aktivität der zellulären DNA bestimmt, und von einigen Zellen wurden Autoradiogramme erstellt (Fig. 3.8.).

nicht vormarkierten Zellen unterschieden werden. Da eine geringere Zellzahl ( $8 \cdot 10^6$  Zellen) eingesetzt wurde, ist eventuell eine stärkere Zellteilungsrate in dem Ansatz vorhanden.



Figur 3.8. DNA-Austausch zwischen BHK 21 Zellen: Häufigkeitsverteilung der Silberkörner pro Zelle. Trypsinierte nicht markierte Zellen wurden mit radioaktiv markierten Zellen im Verhältnis 1 + 1 (A), 3 + 1 (B) und 1 + 2 (C) gemischt. Nach 24 h Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen trypsinisiert, die spezifische Aktivität der zellulären DNA bestimmt (Tab. 3.4.) und einige Zellen zur Autoradiographie verwendet.

### 3.4. Spezifische Aktivität der DNA

#### 3.4.1. Nuklidgehalt im Blutplasma der Mäuse

Der Nuklidgehalt des Gewebewassers wurde aus dem Nuklidgehalt des Blutplasmas bestimmt. Für alle drei Substanzen (HTO, H-3glucose und C-14glucose) war ca. 10 Tage nach Beginn ein steady state erreicht. Der Nuklidgehalt des Blutplasmas nach 16 tägiger Exposition sind für die einzelnen Substanzen in Tabelle 3.5. dargestellt. Bei den mit HTO markierten Tieren ist die Aktivität im Blutplasma und im Gewebewasser etwa 60 % der Aktivität des Trinkwassers. C-14glucose wird hauptsächlich zu C-14O<sub>2</sub> metabolisiert, das ausgeatmet wird. Deshalb ist der Nuklidgehalt von C-14 im Blutplasma der Tiere so gering.

| Substanz          | Geschlecht | Aktivität<br>im<br>Trinkwasser<br>[Bq/ml] | Aktivität<br>im<br>Blutplasma<br>[Bq/ml] | Verhältnis<br>$\frac{\text{Akt. Blutplasma}}{\text{Akt. Trinkwas.}}$ |
|-------------------|------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| HTO               | ♂          | $1.49 \cdot 10^5$                         | $8.59 \cdot 10^4$                        | 0.58                                                                 |
|                   | ♀          | $1.49 \cdot 10^5$                         | $8.84 \cdot 10^4$                        | 0.59                                                                 |
| D-[1-H-3]glucose  | ♂          | $1.69 \cdot 10^4$                         | $1.45 \cdot 10^4$                        | 0.86                                                                 |
|                   | ♀          | $1.72 \cdot 10^4$                         | $1.12 \cdot 10^4$                        | 0.65                                                                 |
| D-[U-C-14]glucose | ♂          | $3.17 \cdot 10^3$                         | $1.43 \cdot 10^2$                        | 0.05                                                                 |
|                   | ♀          | $3.14 \cdot 10^3$                         | $1.46 \cdot 10^2$                        | 0.05                                                                 |

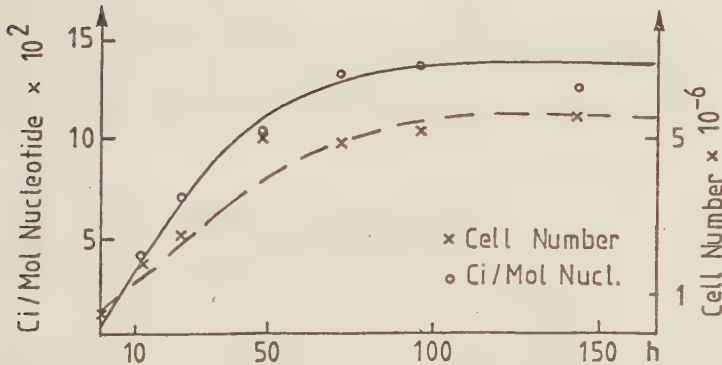
Tabelle 3.5. Nuklidgehalt im Blutplasma der Mäuse nach 16 tägiger Exposition mit HTO, D-[1-H-3]glucose und D-[U-C-14]glucose, nachdem steady state erreicht war.

### 3.4.2. Kinetik des Einbaus der Markierung in die DNA und Ausbau aus der DNA

Zum Nachweis, daß steady state während der Markierung erreicht wurde wurde die Kinetik des Einbaus in die DNA bei beiden Testsystemen untersucht. Bei den Mäusen wurde auch der Ausbau der Labels aus der DNA untersucht.

### 3.4.2. Kinetik des Einbaus der Markierung in die DNA bei Zellkulturen

Die Kinetik des Einbaus von H-3 von D-[1-H-3]glucose in die DNA von Zellen während des exponentiellen Wachstums ist in Fig. 3.9. dargestellt. Die spezifische Aktivität der DNA erreicht etwa 50 h nach dem Einimpfen einen steady state. Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit andern Vorstufen beobachtet.



Figur 3.9. Spezifische Aktivität der DNA von Hamster Fibroblasten, während des exponentiellen Wachstums, in Wachstumsmedium mit 11.1 KBq/ml D-[1-H-3]glucose. Jeder Punkt bildet den Mittelwert von 3 Ansätzen.

### 3.4.2.2. Kinetik des Einbaus der Markierung in die DNA und Ausbau aus der DNA bei verschiedenen Geweben der Maus

Für HTO und D-[U-C-14]glucose wurde die Kinetik des Einbaus in die DNA und des Ausbaus aus der DNA bei Pankreas, Muskel und Milz untersucht. Die **Ergebnisse** sind in Figur 3.10. dargestellt. In allen Geweben findet ein schneller Einbau in die DNA statt, und nach ca. 10 Tagen ist ein steady state erreicht (bei Muskel ca. 20 Tage). Der Einbau der Markierung ist unabhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit der einzelnen Gewebe. Der Ausbau der Markierung zeigt bei beiden Ansätzen einen zwei-phasigen Verlauf, mit:

- (i) einem schnellen Kompartiment, in dem ca. 60 % der Markierung mit einer Halbwertszeit von ca. 10 Tagen ausgebaut wird, und das unabhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit ist, und
- (ii) einem zweiten, langsamen Kompartiment, das von der Proliferationsgeschwindigkeit der einzelnen Gewebe abhängt, und das in der Milz schneller umgesetzt wird, als bei Pankreas und Muskel.

### 3.4.3. Spezifische Aktivität während des Steady states

Die experimentell bestimmte spezifische Aktivität der DNA ist:

$$SA_{\text{exp.}} = \frac{\text{Bq}}{\text{mol Nukleotid}} \quad (3.1)$$

und wird bestimmt aus der Radioaktivität und dem DNA-Gehalt der isolierten DNA. Die Basenzusammensetzung wurde aus dem DNA-Spektrum ermittelt (Hirschman und Felsenfeld 1966) und die Anzahl der Nukleotide wurde berechnet.

Die experimentell bestimmte spezifische Aktivität der DNA, nach Markierung mit verschiedenen Vorstufen, ist für Zellkulturen nach 96 h Exposition und bei den verschiedenen Geweben der Maus nach 32 tägiger Exposition ermittelt worden, und die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6. dargestellt. Außerdem wird die experimentell ermittelte spezifische Aktivität mit der, nach Gleichung 1.2 und mit den Korrekturfaktoren in Tabelle 1.2, berechneten spezifischen Aktivität verglichen..

| Precursor            | Activity in the medium | Specific Activity in precursor (SA) <sub>p</sub>                           | Specific Activity calculated (SA) <sub>theor.</sub>                        | Specific Activity experimental (SA) <sub>exp.</sub>                        | SA <sub>exp.</sub> / SA <sub>theor.</sub>                                  |                                                                            |                      |
|----------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|                      | Bq/ml                  | Bq/mole food                                                               | Bq/mole Nucleotide                                                         | Bq/mole Nukleotide                                                         |                                                                            |                                                                            |                      |
| 1 Cell Cultures V 79 |                        |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                      |
| HTO                  | 5.99 · 10 <sup>6</sup> | 1.07 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 5.12 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 5.18 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.01                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 5.14 · 10 <sup>6</sup> | 9.25 · 10 <sup>7</sup>                                                     | 4.40 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 3.70 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 0.85                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.30 · 10 <sup>6</sup> | 2.34 · 10 <sup>7</sup>                                                     | 1.12 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.11 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.00                                                                       |                                                                            |                      |
| D-[1-H-3]glucose     | 3.70 · 10 <sup>4</sup> | 5.18 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 7.12 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 6.81 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 0.96                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.29 · 10 <sup>4</sup> | 1.81 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 2.48 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 2.57 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 1.03                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.29 · 10 <sup>4</sup> | 1.81 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 2.48 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 2.47 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 1.00                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 9.25 · 10 <sup>3</sup> | 1.29 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 1.78 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 2.09 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 1.17                                                                       |                                                                            |                      |
| D-[U-C-14]glucose    | 2.78 · 10 <sup>3</sup> | 3.89 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 4.36 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 5.51 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.26                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 2.73 · 10 <sup>3</sup> | 3.82 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 4.28 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 4.11 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.04                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.25 · 10 <sup>3</sup> | 1.75 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.96 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 2.09 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 0.94                                                                       |                                                                            |                      |
| L-[2,3-H-3]aspartate | 5.29 · 10 <sup>4</sup> | 5.15 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 6.44 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 4.63 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 0.72                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 3.70 · 10 <sup>4</sup> | 3.60 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 4.50 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 3.29 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 0.73                                                                       |                                                                            |                      |
| BHK 21               |                        |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                      |
| HTO                  | 5.55 · 10 <sup>6</sup> | 9.99 · 10 <sup>7</sup>                                                     | 4.74 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 6.05 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.27                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.48 · 10 <sup>6</sup> | 2.66 · 10 <sup>7</sup>                                                     | 1.26 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.95 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.54                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.40 · 10 <sup>6</sup> | 2.52 · 10 <sup>7</sup>                                                     | 1.20 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.81 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.51                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.20 · 10 <sup>6</sup> | 2.16 · 10 <sup>7</sup>                                                     | 1.03 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.24 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.21                                                                       |                                                                            |                      |
| D-[1-E-3]glucose     | 6.47 · 10 <sup>4</sup> | 2.26 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 3.11 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 2.97 · 10 <sup>9</sup>                                                     | 0.95                                                                       |                                                                            |                      |
|                      | 1.95 · 10 <sup>4</sup> | 6.82 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 9.38 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 9.68 · 10 <sup>8</sup>                                                     | 1.03                                                                       |                                                                            |                      |
| Animals, Mice        |                        |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                      |
| HTO <sup>1)</sup>    | Sex                    | Tissue                                                                     |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                                                                            |                      |
|                      | ♂                      | 1.55 · 10 <sup>6</sup><br>1.55 · 10 <sup>6</sup><br>1.55 · 10 <sup>6</sup> | 7.34 · 10 <sup>5</sup><br>7.34 · 10 <sup>5</sup><br>7.34 · 10 <sup>5</sup> | Pancreas<br>Spleen<br>Muscle                                               | 6.44 · 10 <sup>5</sup><br>3.85 · 10 <sup>5</sup><br>2.11 · 10 <sup>7</sup> | 0.88<br>0.53<br>2.87                                                       |                      |
| D-[1-H-3]glucose     | ♀                      | 1.59 · 10 <sup>6</sup><br>1.59 · 10 <sup>6</sup><br>1.59 · 10 <sup>6</sup> | 7.56 · 10 <sup>5</sup><br>7.56 · 10 <sup>5</sup><br>7.56 · 10 <sup>5</sup> | Pancreas<br>Spleen<br>Muscle                                               | 5.88 · 10 <sup>5</sup><br>3.63 · 10 <sup>5</sup><br>1.48 · 10 <sup>6</sup> | 0.78<br>0.48<br>1.96                                                       |                      |
|                      | ♂                      | 1.20 · 10 <sup>7</sup><br>1.20 · 10 <sup>7</sup><br>1.20 · 10 <sup>7</sup> | 1.65 · 10 <sup>7</sup><br>1.65 · 10 <sup>7</sup><br>1.65 · 10 <sup>7</sup> | Pancreas<br>Spleen<br>Muscle                                               | 1.17 · 10 <sup>6</sup><br>1.07 · 10 <sup>6</sup><br>4.79 · 10 <sup>6</sup> | 0.07<br>0.06<br>0.29                                                       |                      |
|                      | ♀                      | 1.63 · 10 <sup>7</sup><br>1.63 · 10 <sup>7</sup><br>1.63 · 10 <sup>7</sup> | 2.24 · 10 <sup>7</sup><br>2.24 · 10 <sup>7</sup><br>2.24 · 10 <sup>7</sup> | Pancreas<br>Spleen<br>Muscle                                               | 1.89 · 10 <sup>6</sup><br>1.35 · 10 <sup>6</sup><br>4.89 · 10 <sup>6</sup> | 0.08<br>0.06<br>0.22                                                       |                      |
|                      | D-[U-C-14]glucose      | ♂                                                                          | 2.44 · 10 <sup>6</sup><br>2.44 · 10 <sup>6</sup><br>2.44 · 10 <sup>6</sup> | 2.73 · 10 <sup>6</sup><br>2.73 · 10 <sup>6</sup><br>2.73 · 10 <sup>6</sup> | Pancreas<br>Spleen<br>Muscle                                               | 9.11 · 10 <sup>5</sup><br>7.52 · 10 <sup>5</sup><br>3.28 · 10 <sup>6</sup> | 0.33<br>0.28<br>1.20 |
|                      |                        | ♀                                                                          | 2.41 · 10 <sup>6</sup><br>2.41 · 10 <sup>6</sup><br>2.41 · 10 <sup>6</sup> | 2.70 · 10 <sup>6</sup><br>2.70 · 10 <sup>6</sup><br>2.70 · 10 <sup>6</sup> | Pancreas<br>Spleen<br>Muscle                                               | 7.42 · 10 <sup>5</sup><br>5.08 · 10 <sup>5</sup><br>2.62 · 10 <sup>6</sup> | 0.27<br>0.19<br>0.97 |

Tab. 3.6. Berechnete und experimentell bestimmte spezifische Aktivität der DNA von Zellkulturen (V 79, BHK 21) und verschiedenen Geweben der Maus nach Erreichen des Steady states.

1) Die Aktivität des Gewebewassers wurde zu Grunde gelegt

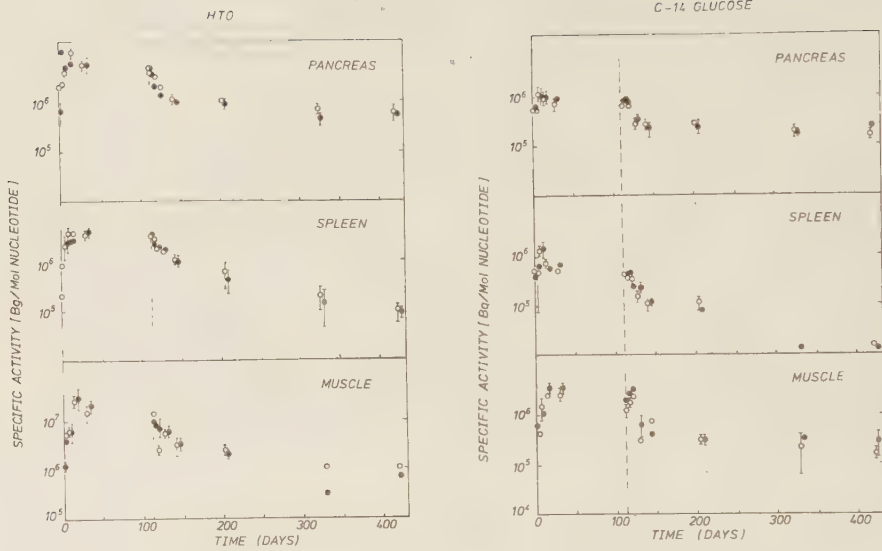


Fig. 3.10. Spezifische Aktivität in der DNA von Pankreas, Milz und Muskel von Mäusen während und nach kontinuierlicher Markierung mit HTO (160 KBq/ml) und D-[U-C-14]glucose (3.4 KBq/ml) mit dem Trinkwasser bis zum Tag 112. Die Punkte bilden den Mittelwert von 3 Messungen, und die Standardabweichung ist angegeben.

Bei den Zellkulturen ist für alle verwendeten Vorstufen, mit Ausnahme von Aspartat das Verhältnis  $SA_{exp}/SA_{theor}$  gleich 1. Das zeigt, daß die spezifische Aktivität der DNA bei Zellkulturen berechnet werden kann, und daß Zellkulturen ein geeignetes System zur Untersuchung der spezifischen Aktivität darstellen. Die bei HTO Markierung zwischen BHK 21 und HF Zellen auftretenden Unterschiede können auf Stoffwechselunterschiede z.B. unterschiedliche Aktivität des oxidativen vs. nichtoxidativen PentosePhosphat- Zyklus zurückgeführt werden.

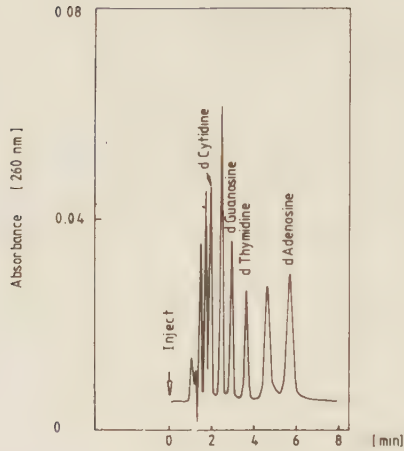
Die Markierung der DNA der einzelnen Gewebe der Maus ist komplexer, und deshalb sind Unterschiede in der spezifischen Aktivität der DNA der einzelnen Gewebe zu beobachten. Bei allen Geweben ist die experimentell bestimmte spezifische Aktivität der Muskel DNA am höchsten und die der Milz am geringsten. Die experimentell gemessene spezifische Aktivität der DNA bei Pankreas (bei HTO-Markierung) und die der Muskel-DNA (bei C-14 glucose Markierung) entspricht der theoretisch berechneten spezifischen Aktivität.

#### 3.4.4. Nachweis des Einbaus auf Nukleosid-Ebene

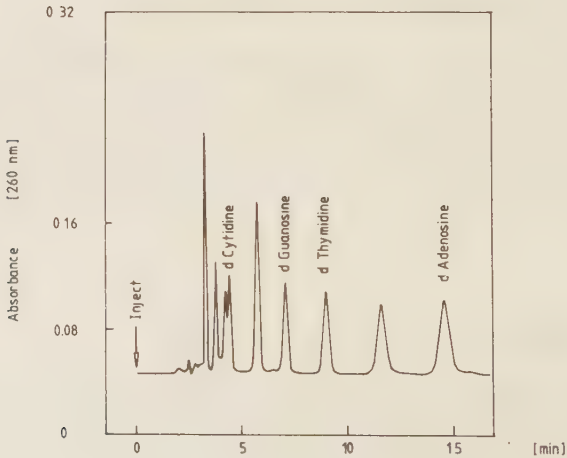
Zur Überprüfung der bei der theoretischen Berechnung der spezifischen Aktivität postulierten Einbauwege (Kap. 1.4.1.) wurde die DNA von Zellen, die in Medium mit HTO wuchsen, auf Nukleosidebene untersucht. Die DNA wurde mit DNase I, Nuklease P1 und alkalischer Phosphatase verdaut und die einzelnen Nukleoside durch HPLC getrennt.

##### 3.4.4.1. Trennung der Nukleoside durch HPLC

Die Nukleoside können durch HPLC unter isokratischen Bedingungen innerhalb von 6 min vollständig getrennt werden. Die analytische Trennung der enzymatisch verdauten DNA zeigt neben den Nukleosiden noch zusätzliche, nicht identifizierte Peaks, die dazu führen, daß Cytidin nicht auf Baseline - Niveau getrennt werden kann (Figur 3.11.).



Figur 3.11. Isokratische HPLC-Trennung der mit DNase I, Nuklease P1 und alkalischer Phosphatase verdauten DNA.



Figur 3.12. Präparative HPLC-Trennung der mit DNase I, Nuklease P1 und alkalischer Phosphatase verdauten DNA.

Unter präparativen Bedingungen werden die einzelnen Nukleoside, mit Ausnahme von dCytidin, so getrennt, daß sie einfach von Hand fraktioniert werden können (Fig. 3.12.) und die spezifische Aktivität der einzelnen Nukleoside bestimmt werden kann.

#### 3.4.4.2. Spezifische Aktivität der Nukleoside

Die spezifische Aktivität der einzelnen Nukleoside nach enzymatischer Verdauung und HPLC-Trennung der mit HTO markierten DNA von BHK 21 Zellen ist in Tabelle 3.7. dargestellt. Die unterschiedliche spezifische Aktivität der einzelnen Nukleoside kann auf die unterschiedliche Anzahl der markierten H-Atome zurückgeführt werden, da bei Berücksichtigung der Anzahl markierbarer H-Atome die spezifische Aktivität pro H-Atom bei den einzelnen Nukleosiden nur geringfügig schwankt.

Der experimentelle Fehler bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA ist an anderer Stelle diskutiert (Zipfel 1980).

Spezifische Aktivität der DNA  $SA_{DNA} = 1.23 \cdot 10^8$  Bq/mol Nukleotid  
nach Isolierung der einzelnen Nukleoside über HPLC

| Nukleosid | SA<br>[Bq/mol-Nukleo-<br>sid] | Anzahl der H-Atome<br>die markiert wer-<br>den können | SA<br>[Bq/mol H]  |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
| dCytidin  | $3.12 \cdot 10^8$             | 5                                                     | $6.24 \cdot 10^7$ |
| dGuanin   | $2.40 \cdot 10^8$             | 4                                                     | $6.00 \cdot 10^7$ |
| dThymidin | $5.18 \cdot 10^8$             | 6                                                     | $8.63 \cdot 10^7$ |
| dAdenosin | $2.24 \cdot 10^8$             | 4                                                     | $5.60 \cdot 10^7$ |

Tab. 3.7. Spezifische Aktivität der einzelnen Nukleoside nach enzymatischer Verdauung und HPLC-Trennung der mit HTO markierten DNA von BHK 21 Zellen.

Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität der einzelnen Nukleoside findet beim Ausfällen der DNA ein DNA-Verlust statt, da die Fällung mit Cetylpyridiniumbromid nicht vollständig ist (Geck und Nász 1983); dies hat jedoch keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität.

Bei der enzymatischen Verdauung der DNA muß die Möglichkeit eines Isotopeneffekts (Palm et al. 1968) berücksichtigt werden, der zu einer Veränderung der spezifischen Aktivität führen kann.

### 3.5. Bestimmung des DNA-turnovers

#### 3.5.1. DNA-turnover an nicht teilenden Geweben der Maus

Die spezifische Aktivität der DNA von Pankreas, Milz und Muskel während und nach kontinuierlicher Markierung mit HTO und D-[U-C-14]glucose zeigt bei allen Geweben sowohl einen schnellen Einbau der Nuklide in die DNA während der Markierung, als auch einen zweiphasigen Ausbau der Nuklide aus der DNA nach der kontinuierlichen Markierung (Fig. 3.10.).

Bei Milz kann der Ein- und Ausbau der Nuklide in die DNA durch Zellteilung und replikative DNA-Synthese erklärt werden. Bei Pankreas und Muskel ist die Zellteilungsrate sehr gering ( $T_{1/2} > 100$  d; Cameron 1971), so daß der Ein- und Ausbau nicht auf replikative DNA-Synthese zurückgeführt werden kann.

Bei beiden Precursoren zeigt der Ausbau der Nuklide aus der DNA bei allen Geweben einen zweiphasigen Verlauf, der mit folgender Formel beschrieben werden kann:

$$\text{spezifische Aktivität} = a_1 \cdot e^{-k_1 t} + a_2 \cdot e^{-k_2 t} \quad (3.1)$$

wobei  $a_1, a_2$  die relativen Poolgrößen der markierten DNA sind, und

$k_1, k_2$  die Zerfallskonstanten sind.

Die einzelnen Konstanten wurden aus den experimentellen Werten bestimmt und sind in Tab. 3.8. dargestellt. Sie zeigen, daß in den verschiedenen Geweben ein relativ großer Anteil der markierten DNA mit einer Halbwertszeit von ca. 10 Tagen umgesetzt wird.

| Gewebe <sup>1)</sup> | Precursor       | DNA-Pool mit<br>schnellem turnover |                                              | DNA-Pool mit<br>langsamen turnover |                                              |
|----------------------|-----------------|------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|
|                      |                 | relative<br>Poolgröße              | Zerfalls-<br>konstante<br>[d <sup>-1</sup> ] | relative<br>Poolgröße              | Zerfalls-<br>konstante<br>[d <sup>-1</sup> ] |
|                      |                 | a <sub>1</sub>                     | k <sub>1</sub>                               | a <sub>2</sub>                     | k <sub>2</sub>                               |
| Pankreas             | HTO             | 0.78                               | 0.17                                         | 0.22                               | 0.003                                        |
|                      | C-14<br>glucose | 0.80                               | 0.22                                         | 0.20                               | 0.002                                        |
| Milz                 | HTO             | 0.57                               | 0.08                                         | 0.43                               | 0.009                                        |
|                      | C-14<br>glucose | 0.73                               | 0.10                                         | 0.27                               | 0.008                                        |
| Muskel <sup>2)</sup> | HTO             | 0.62                               | 0.08                                         | 0.38                               | 0.007                                        |
|                      | c-14<br>glucose | 0.88                               | 0.17                                         | 0.12                               | 0.002                                        |

Tab. 3.8. Relative Poolgröße (a<sub>1</sub>) und relative Zerfallskonstante (k<sub>1</sub>) beim Ausbau von H-3 bzw. C-14 aus der DNA von verschiedenen Geweben der Maus (Fig. 3.10.). Die Tiere erhielten kontinuierlich, 112 Tage lang, HTO bzw. D-[U-C-14]glucose mit dem Trinkwasser. Danach wurde die radioaktive Quelle abgesetzt und der Ausbau der Nuklide aus der DNA verfolgt.

1) Es wurde nicht zwischen weiblichen und männlichen Tieren unterschieden, da kein signifikanter Unterschied der einzelnen Werte beobachtet wurde.

2) M. quadriceps femoralis links

### 3.5.2 Bestimmung des DNA-turnovers an konfluenten Zellkulturen

Zur weiteren Untersuchung des DNA-turnovers wurden kultivierte Säugerzellen in vitro eingesetzt. Neben dem geringen materiellen und zeitlichen Aufwand bieten Zellkulturen auch den Vorteil, Un-

tersuchungen an einer homogenen Zellpopulation unter definierten Bedingungen durchzuführen.

### 3.5.2.1. Das Untersuchungssystem

Konfluente Zellen sollten ein geeignetes System zur Untersuchung des DNA-turnovers darstellen ; deshalb wurden verschiedene Zelllinien (BHK 21, CHO und MRC-5) in konfluentem Stadium am achten Tag nach dem Einimpfen verwendet, und der Einbau von H-3dThd in die DNA, bzw. der Ausbau von H-3 aus der DNA als Maß für den DNA-turnover untersucht.

Um während des Experiments eine Verarmung des Wachstumsmediums mit Nährstoffen auszuschließen, wurde frisches Wachstumsmedium zu Beginn zugegeben. Es ist allerdings bekannt, daß ein Mediumwechsel oder die Zugabe von frischem Serum zu konfluenten Zellen bei einigen Zellen eine Stimulierung der DNA-Synthese und Zellteilung bewirken kann (Kap. 1.2.2.2.).

Da bei geringer Serumkonzentration (0.5 %) Zellen in nicht mitotischem Zustand über lange Zeit (bis 117 Tage) gehalten werden können (Dell'Orco et al. 1973), und bei einer Serumkonzentration von 2 % nur eine Stimulierung von 0.5 % der Zellen beobachtet wurde (Todaro et al. 1965), wurde sowohl Wachstumsmedium mit normalem (10 % und 20 %), als auch mit geringem Serumgehalt (0.5 % und 1 %) verwendet.

Etwa 3 bis 4 Tage nach dem Einimpfen haben die verwendeten Zellen Konfluenz erreicht und es sind mikroskopisch keine freien Flächen mehr erkennbar ; d.h. alle Zellen sind in  $G_1$ - oder  $G_0$ -Phase. Zur Untersuchung der Kinetik des Einbaus von H-3dThd in die DNA, bzw. des Ausbaus von H-3 aus der DNA, wurde 8 Tage nach dem Einimpfen das Medium gewechselt und die spezifische Aktivität der DNA verfolgt.

Zum Nachweis der Wachstumsinhibition durch hohe Zellzahl wurde während der Versuche Zellzahl und DNA-Gehalt pro Kulturflasche beobachtet. In Fig. 3.13. sind die beiden Parameter Zellzahl und DNA-Gehalt pro Kulturflasche für die beiden Zelllinien BHK 21 und MRC-5 nach dem Mediumwechsel dargestellt. Es zeigt sich, daß konfluente BHK 21

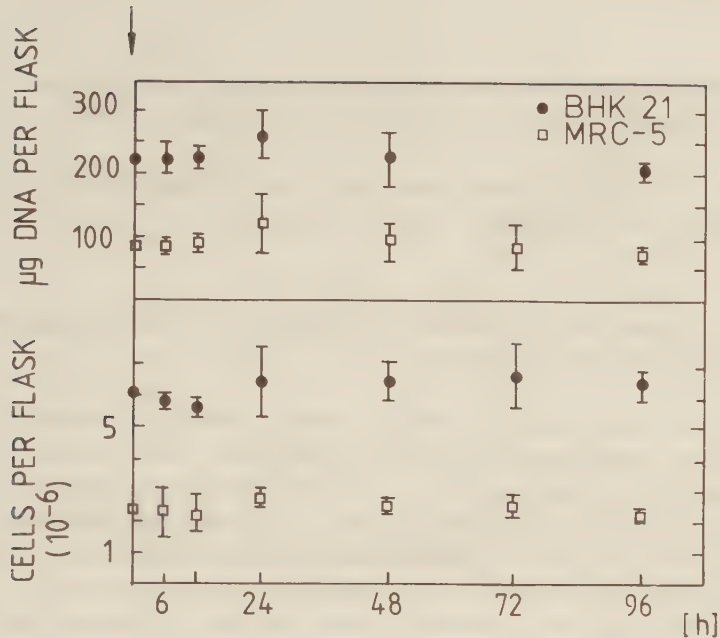


Fig. 3.13. Zellzahl und DNA-Gehalt pro Kulturflasche von BHK 21 und MRC-5 Zellen während der Experimente. Jeder Punkt gibt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Acht Tage nach dem Einimpfen der Zellen wurde das Wachstumsmedium (20 % fötalem Kälberserum) gewechselt ( $t = 0, \uparrow$ ) und der Einbau von H-3 dThd in die DNA, bzw. der Ausbau von H-3 aus der DNA wurde untersucht.

und MRC-5 Zellen, die am achten Tag nach dem Einimpfen neues Medium erhielten, noch über mindestens 4 Tage in Kultur gehalten werden können, ohne daß eine Reduktion der Zellzahl oder des DNA-Gehalts zu beobachten ist. Auch am sechsten Tag nach dem Mediumwechsel waren noch keine abgelösten, toten Zellen im Medium zu sehen.

Da die Zellen beim Ablösen mit Trypsin geschädigt werden (Kap. 3.2) ist der Parameter Zellzahl mit einem größeren Fehler behaftet als der Parameter DNA-Gehalt pro Kulturflasche. Der DNA-Gehalt pro Kulturflasche steigt bei beiden Zelllinien innerhalb der ersten 24 h leicht an (bei BHK 21 Zellen ca. 12 %, bei MRC-5 Zellen ca.

8 %). Bei der Zellzahl ist ebenfalls ein leichter Anstieg nach 24 h zu beobachten (bei BHK 21 Zellen ca. 10 %, und bei MRC-5 Zellen ca. 14 %).

Die gleichen Ergebnisse wurden auch bei einem Serumgehalt von 0.5 % und 1 % beobachtet (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 3.5.2.2. Bestimmung des Einbaus von H-3dThd in die DNA, bzw. des Ausbaus von H-3 aus der DNA

Die Kinetik und das Ausmaß des DNA-turnovers wurden an konfluenten Zellen von verschiedenen Zelllinien, beginnend am achten Tag nach dem Einimpfen, bestimmt. Die Stationarität dieser Zellen ist an Hand der Parameter DNA-Gehalt pro Kulturflasche und Zellzahl dargestellt (Kap. 3.5.2.1.). Sowohl der Einbau von H-3dThd in die DNA, als auch der Ausbau von H-3 aus der DNA der Zellen, die während des Wachstums mit H-3dThd markiert wurden, wurde bei verschiedenen Serumkonzentrationen untersucht. Bei Versuchsbeginn ( $t = 0$ ), i.e. acht Tage nach dem Einimpfen, wurden die Zellen, vor der Zugabe von Medium mit bzw. ohne H-3dThd, zweimal mit PBS Puffer gewaschen.

##### 3.5.2.2.1. Bei BHK 21 Zellen

Der Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen bei 1 % und 20 % Serum ist in Fig. 3.14. dargestellt. Die Serumkonzentration hat einen Einfluß auf die Höhe des Einbaus: bei 1 % Serum zeigt der Einbau während der ersten 24 h einen deutlichen Peak; danach nimmt die spezifische Aktivität der DNA etwa um die Hälfte ab. Bei 20 % Serum ist kein deutlicher Einbauppeak zu sehen. In den ersten 24 h wird etwa ein Drittel der Aktivität, verglichen mit dem Wert bei 1 % Serum, eingebaut. Danach nimmt die spezifische Aktivität langsam zu und nach 96 h ist sie bei beiden Serumkonzentrationen gleich.

Fig. 3.15. zeigt den Ausbau von H-3 aus der DNA von BHK 21 Zellen, die während ihres Wachstums mit H-3dThd markiert wurden. Innerhalb von 6 - 12 h wird die spezifische Aktivität bei beiden Serumkon-

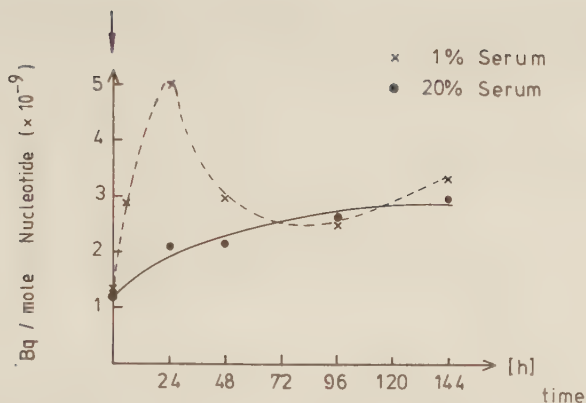


Fig. 3.14. Einbau von H-3 in die DNA konfluenter BHK 21 Zellen. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. acht Tage nach dem Einimpfen) erhielten die Zellen Medium mit 1 % (X) oder 20 % (●) 'newborn' Kälberserum mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3 dThd (↓).

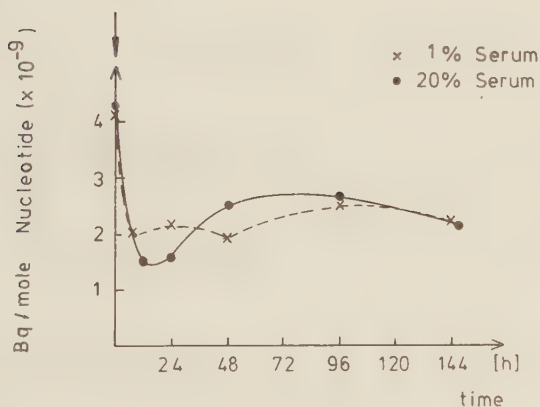


Fig. 3.15. Ausbau von H-3 aus der DNA von BHK 21 Zellen, die in Wachstumsmedium mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3 dThd bis zur Konfluenz wuchsen. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. acht Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium abgegossen, die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen, und frisches Medium mit 1 % (X) oder 20 % (●) 'newborn' Kälberserum zugegeben (↓).

zentrationen auf ein Drittel reduziert, steigt danach wieder leicht an und bleibt dann konstant. Die spezifische Aktivität der DNA nimmt etwa um die Hälfte ab.

#### 3.5.2.2.2. Bei CHO Zellen

Zum Nachweis, daß die beobachteten Phänomene nicht spezifisch für BHK 21 Zellen sind, wurden die gleichen Untersuchungen an anderen Zelllinien durchgeführt.

Der Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten CHO Zellen bei 1 % und 20 % Serum ist in Figur. 3.16. dargestellt. Wie bei BHK 21 Zellen verläuft der Einbau bei beiden Serumkonzentrationen unterschiedlich. Bei 1 % Serum ist der Einbau während der ersten 24 h größer als bei 20 %, zeigt aber keinen Peak wie bei BHK 21 Zellen. Nach 24 h ist der Einbau bei 20 % Serum nur halb so hoch wie bei 1 %, nimmt aber kontinuierlich zu und nach 96 h ist die spezifische Aktivität bei beiden Serumkonzentrationen gleich.

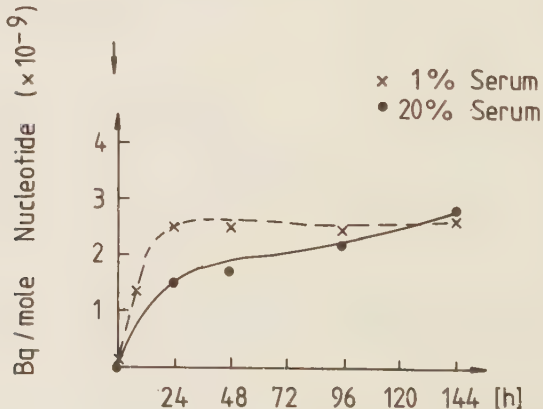


Fig. 3.16. Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten CHO Zellen.  
Zum Zeitpunkt 0 (i.e. acht Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium gewechselt (↓) und die Zellen erhielten frisches Medium mit 1 % (x) oder 20 % (•) newborn Kälberserum mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd.

Der Ausbau von H-3 aus der DNA von konfluenten CHO Zellen bei unterschiedlichem Serumgehalt ist in Figur 3.17. dargestellt. Der Verlauf ist vergleichbar mit den Ergebnisse von BHK 21 Zellen. Innerhalb der ersten sechs Stunden nimmt die spezifische Aktivität bei beiden Serumkonzentrationen um die Hälfte ab, nimmt danach wieder zu, und nach 96 h ist die spezifische Aktivität bei beiden Serumkonzentrationen gleich.

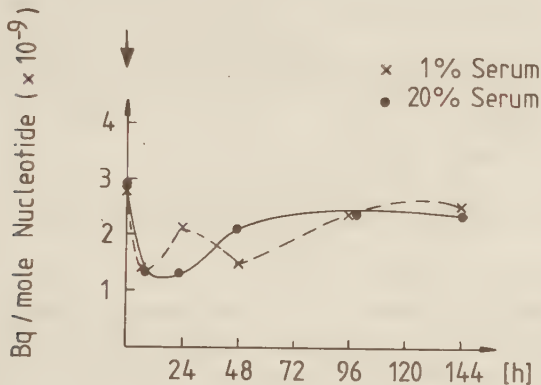


Fig. 3.17. Ausbau von H-3 aus der DNA von CHO Zellen, die in Wachstumsmedium mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd bis zur Konfluenz wuchsen. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. acht Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium abgegossen ( $\downarrow$ ), die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen und frisches Medium mit 1 % (X) oder 20 % (●) 'newborn' Kälberserum zugegeben.

#### 3.5.2.2.3. Bei MRC-5 Zellen

Eine dritte Zelllinie, menschliche Fibroblasten (MRC-5) wurden zur Untersuchung des DNA-turnovers eingesetzt.

Der Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten MRC-5 Zellen bei 0.5 % und 20 % Serum ist in Figur 3.18 dargestellt. Bei 0.5 % Serum ist nach 24 h ein leichter Einbauppeak zu sehen, und bei 20 % ist der Einbau nach 24 h fast genauso hoch wie bei 0.5 % Serum. Danach bleibt die spezifische Aktivität konstant. Der Umfang

des DNA-turnovers ist bei MRC-5 Zellen um die Hälfte geringer als bei BHK 21 und CHO Zellen.

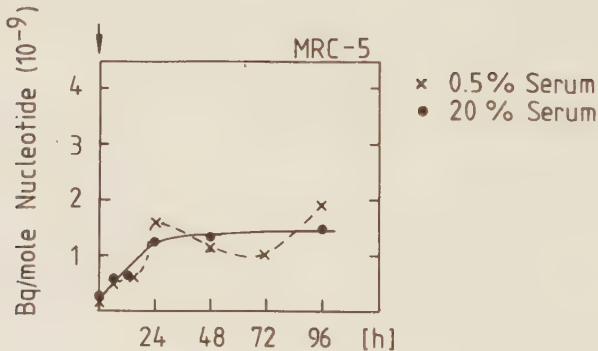


Fig. 3.18. Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten MRC-5 Zellen. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. 8 Tage nach dem Einimpfen) wurde das Wachstumsmedium gewechselt ( $\downarrow$ ) und die Zellen erhielten frisches Medium mit 1 % (X) oder 20 % (●) 'newborn' Kälberserum mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd.

#### 3.5.2.2.4. Zusammenfassung

Drei verschiedenen Zelllinien wurden in stationärem Zustand zur Untersuchung des DNA-turnovers verwendet, und der Einbau von H-3dThd in die DNA, und der Ausbau von H-3 aus der DNA wurde als Maß für die Instabilität der DNA benutzt. Die Ergebnisse zeigen:

- (i) die Zellen sind auch noch sechs Tage nach dem Mediumwechsel (i.e. 14 Tage nach dem Einimpfen) lebensfähig,
- (ii) bei allen drei Zelllinien ist innerhalb der ersten 24 h nach dem Mediumwechsel ein deutlicher Einbau von H-3dThd in die DNA zu beobachten,
- (iii) bei allen Zellen ist der Einbau nach 24 h bei geringer Serumkonzentration höher,
- (iv) nach 96 h ist die spezifische Aktivität der DNA bei allen

- drei Zelllinien bei beiden Serumkonzentrationen gleich,
- (v) das Ausmaß des Einbaus ist bei BHK 21 Zellen am größten, und bei MRC-5 Zellen am geringsten. Die spezifische Aktivität der DNA von BHK 21 Zellen ist nach 96 h doppelt so hoch wie bei MRC-5 Zellen,
  - (vi) der Ausbau von H-3 aus der DNA verläuft anders als der Einbau. Zwölf Stunden nach dem Mediumwechsel ist die spezifische Aktivität der DNA mindestens um die Hälfte geringer,
  - (vii) der Ausbau zeigt einen geringeren Unterschied für beide Serumkonzentrationen. Bei der niederen Serumkonzentration ist der Ausbau etwas geringer,
  - (viii) das Ausmaß des Ausbaus ist bei BHK 21 Zellen größer als bei CHO Zellen.

#### 3.5.2.3. Gleichzeitige Beobachtung des Ausbaus und des Einbaus

Um den unterschiedlichen Verlauf der spezifischen Aktivität der DNA beim Einbau und beim Ausbau von H-3dThd zu erklären (Kap. 3.5.2.2.) wurde der Einbau und der Ausbau gleichzeitig untersucht. Die DNA der Zellen wurde während des Wachstums mit H-3dThd markiert, und nach Erreichen der Konfluenz wurde der Ausbau von H-3 aus der DNA und der Einbau von C-14dThd in die DNA beobachtet. Als Testsystem wurden sowohl BHK 21 Zellen bei 20 % Serum, als auch MRC-5 Zellen bei 0.5 % und 20 % Serum verwendet.

##### 3.5.2.3.1. Bei BHK 21 Zellen

Für BHK 21 Zellen ist der Ausbau von H-3 aus der DNA und der gleichzeitige Einbau von C-14dThd in die DNA bei 20 % Serum in Figur 3.19. dargestellt. Die Kurven für den Einbau und den Ausbau verlaufen annähernd parallel. Während der ersten 6 h nach dem Mediumwechsel steigt die Aktivität von beiden Nukliden in der DNA an und geht nach 12 h wieder auf den Ausgangswert zurück. Nach 24 h ist die H-3 Aktivität wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen, während die C-14 Aktivität der DNA angestiegen ist. Für beide Nuklide wird nach 72 h eine erhöhte Aktivität beobachtet. Bei der gleichzeitigen Beobachtung des Ausbaus und des Einbaus

ist der Verlauf der spezifischen Aktivität anders, als wenn beide getrennt untersucht werden (Fig. 3.14. und 3.15.), und eine Beeinflussung beider Nuklide im Nukleotidpool ist über den Salvagepathway möglich (Kap.4.5.5.).

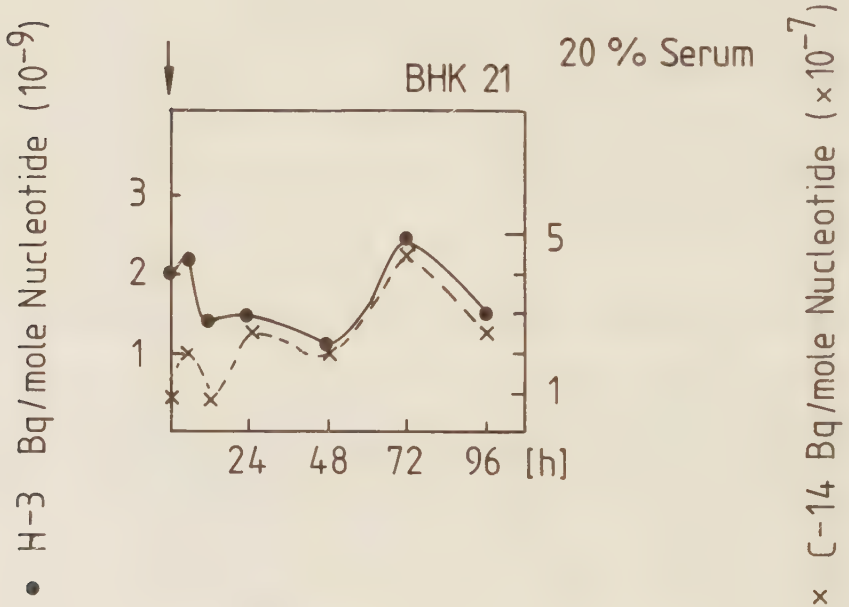


Fig. 3.19. Ausbau von H-3 (●) aus der DNA und Einbau von C-14dThd (x) in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen. Die Zellen wuchsen bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. acht Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium abgegossen (↓), die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen, und frisches Medium mit 37 Bq/ml (1 nCi/ml) C-14dThd und 20 % 'newborn' Kälberserum wurde zugegeben.

#### 3.5.2.3.2. Bei MRC-5 Zellen

Der Ausbau von H-3 aus der DNA und der gleichzeitige Einbau von C-14dThd in die DNA ist für MRC-5 Zellen bei 0.5 % Serum und 20 % Serum in Figur 3.20, bzw. 3.21. dargestellt.

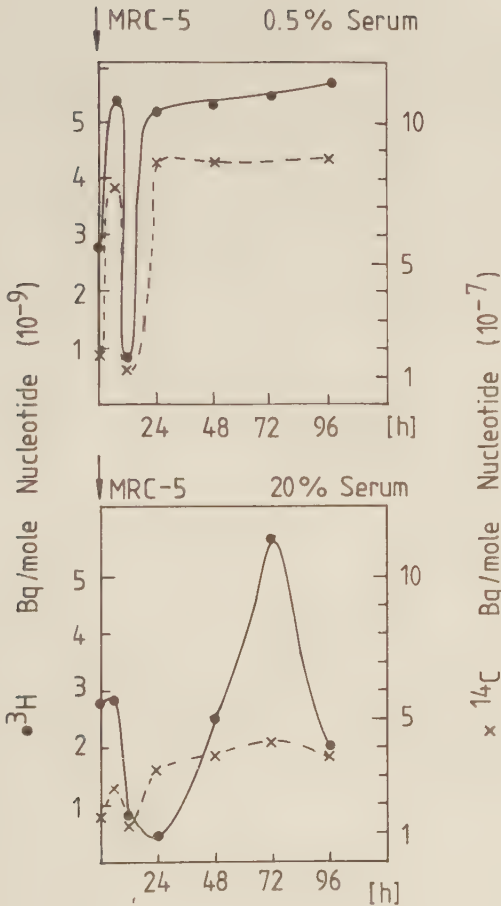


Fig. 3.20., 3.21. Ausbau von  $\text{H-3}$  (●) und Einbau von  $\text{C-14dThd}$  (x) in der DNA von konfluenten MRC-5 Zellen. Die Zellen wuchsen bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium mit  $370 \text{ Bq/ml}$  ( $0.01 \mu\text{Ci/ml}$ )  $\text{H-3dThd}$ . Zum Zeitpunkt 0 (i.e. acht Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium abgegossen (▼), die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen, und frisches Medium mit  $37 \text{ Bq/ml}$  ( $1 \text{ nCi/ml}$ )  $\text{C-14dThd}$  und 0.5 % (Fig. 3.20.) bzw. 20 % 'newborn' Kälberserum (Fig. 3.21.) zugegeben.

Bei 0.5 % Serum verlaufen die Kurven für den Einbau und den Ausbau parallel. Innerhalb der ersten 6 h nach dem Mediumwechsel hat sich die H-3 Aktivität der DNA verdoppelt, sie sinkt nach 6 h ab, und erreicht nach 24 h wieder das Niveau von 6 h. Danach bleibt die H-3 Aktivität annähernd gleich. Der Anstieg der H-3 Aktivität nach Inkubation in Wachstumsmedium mit C-14dThd ist unerwartet und kann durch einen veränderten Nukleotidpool erklärt werden (Kap. 4.5.5.). Der Einbau von C-14dThd in die DNA zeigt ebenfalls einen Peak nach 6 h, nimmt nach 12 h wieder ab, und nach 24 h ist ein Gleichgewicht erreicht.

Bei 20 % Serum bleibt die H-3 Aktivität der DNA innerhalb der ersten 6 h nach dem Mediumwechsel unverändert, sinkt nach 12 h auf etwa ein Drittel ab, und steigt nach 24 h wieder an. Nach 72 h ist für H-3, wie bei BHK 21 Zellen, ein Einbauppeak zu beobachten. Der Einbau von C-14dThd in die DNA verläuft in etwa parallel zur H-3 Kurve, zeigt aber keinen Einbauppeak nach 72 h.

#### 3.5.2.3.3. Zusammenfassung

Bei allen drei Versuchen ist der Kurvenverlauf für den Einbau von C-14dThd in die DNA, bzw. der "Ausbau" von H-3 aus der DNA in etwa parallel. Der Einbau von C-14dThd in die DNA zeigt einen Peak nach 6 h; nach 12 h ist die spezifische Aktivität fast auf das Ausgangsniveau zurückgegangen und nach 24 h ist wieder ein deutlicher Einbau zu beobachten. Danach bleibt die spezifische Aktivität konstant.

Der Verlauf der H-3 Aktivität zeigt 6 h nach dem Mediumwechsel keine Veränderung, bzw. eine Verdoppelung der spezifischen Aktivität (Fig. 3.20.), nach 12 h ist die spezifische Aktivität deutlich verringert, und ist nach 24 h fast wieder auf das Ausgangsniveau angestiegen.

Bei 0.5 % Serum ist die Veränderung der spezifischen Aktivität von H-3 und C-14 deutlich höher als bei 20 % Serum, was durch eine höhere Effizienz des Salvagepathways erklärt werden kann (Kap. 4.5.5.).

#### 3.5.2.4. Einfluß des Mediumwechsels auf den beobachteten DNA-turnover bei BHK 21 Zellen

Bei konfluenten 3T3 Zellen und WI 38 Zellen ist eine Stimulierung der DNA-Synthese 16 - 20 h nach Mediumwechsel (10 % Serum) beschrieben (Todaro et al. 1965, Bombik und Baserga 1976 ; Kap. 4.5.3.). Um einen möglichen Effekt des Mediumwechsels bei der Bestimmung des DNA-turnovers nachzuweisen, wurde sowohl der Einbau von H-3dThd in die DNA, als auch der Ausbau von H-3 aus der DNA bei konfluenten BHK 21 Zellen ohne Mediumwechsel und bei täglichem Mediumwechsel untersucht.

##### 3.5.2.4.1. Einbau von H-3dThd bei täglichem Mediumwechsel

Der Einfluß des täglichen Mediumwechsels mit 1 % und 20 % Serum auf den Einbau von H-3dThd in die DNA konfluenter BHK 21 Zellen ist in Fig. 3.22. dargestellt. Bei beiden Serumkonzentrationen ist ein Einbaupik 6 h nach dem ersten Mediumwechsel zu beobachten, nach 12 h ist die Aktivität fast auf das Ausgangsniveau zurückgegangen und steigt danach kontinuierlich an. Im Vergleich zu Fig. 3.14., wobei das Medium nur einmal zum Zeitpunkt 0 gewechselt wurde, ist bei täglichem Mediumwechsel die spezifische Aktivität der DNA bei beiden Serumkonzentrationen deutlich höher.

Da die Stimulierung der DNA-Synthese erst 16 - 20 h nach dem Mediumwechsel einsetzt (das entspricht der Dauer der  $G_0$ - und  $G_1$ -Phase bis zum Einsetzen der S-Phase) kann der Einbaupik nach 6 h nicht auf die DNA-Synthese durch den Mediumwechsel zurückgeführt werden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die Zunahme der spezifischen Aktivität nach 24 h zum Teil auf die Stimulierung der DNA-Synthese zurückzuführen ist. Bei 20 % Serumkonzentration ist die Einbaurate innerhalb der ersten 24 h höher als innerhalb der zweiten 24 h.

Die Faktoren, die zur Stimulierung der DNA-Synthese durch Mediumwechsel führen sind vor allem im Serum enthalten, weshalb der Anteil der stimulierten Zellen von der Serumkonzentration abhängt (Kap. 4.5.3.). Eine derartige Abhängigkeit kann in

Fig. 3.22. nicht beobachtet werden, vielmehr ist die spezifische Aktivität der DNA bei 1 % Serum höher als bei 20 %. Bei 20 % wurden 3 unabhängige Ansätze durchgeführt. Die Mittelwerte und die angegebene Standardabweichung zeigen, daß die beobachteten Variationen nicht im Fehlerbereich der Messungen liegen.

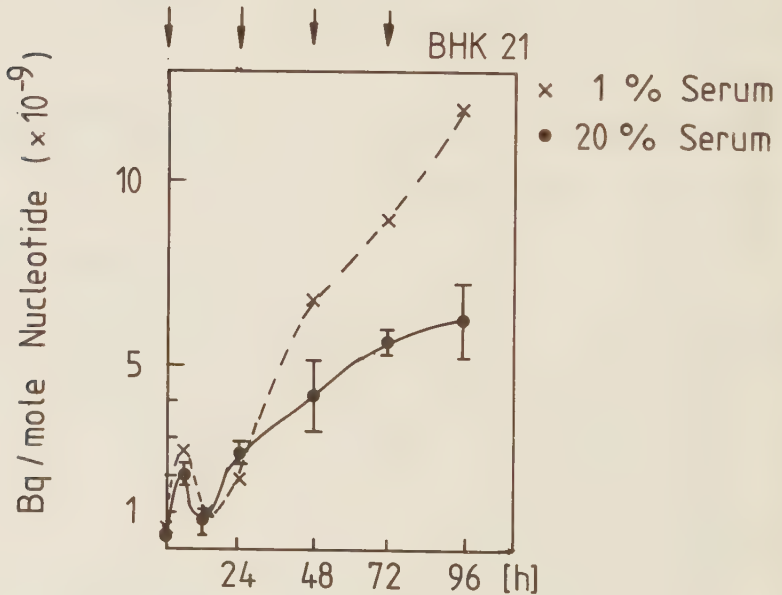


Fig. 3.22 Einbau von H-3 in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. 8 Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium gewechselt ( $\downarrow$ ) und die Zellen erhielten frisches Medium mit 1 % (X) oder 20 % (•) fötalem Kälberserum mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd. Das Medium wurde täglich gewechselt ( $\downarrow$ ). Bei 20 % Serum geben die Punkte den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen an.

3.5.2.4.2. Einbau während des exponentiellen Wachstums und Ausbau,  
bei täglichem Mediumwechsel

Der Verlauf der spezifischen Aktivität während des exponentiellen Wachstums und der Ausbau der Markierung nach Erreichen der Konfluenz, bei täglichem Mediumwechsel ist in Fig. 3.23. dargestellt. Während des exponentiellen Wachstums ist die spezifische Aktivität der DNA nach 2 Tagen am höchsten und sinkt am dritten und vierten Tag, wenn die Zellen Konfluenz erreichen, wieder ab. Der Ausbau von H-3 aus der DNA ist 12 h nach der Inkubation in nicht radioaktivem Medium mit 1 % und 20 % Serum am stärksten.

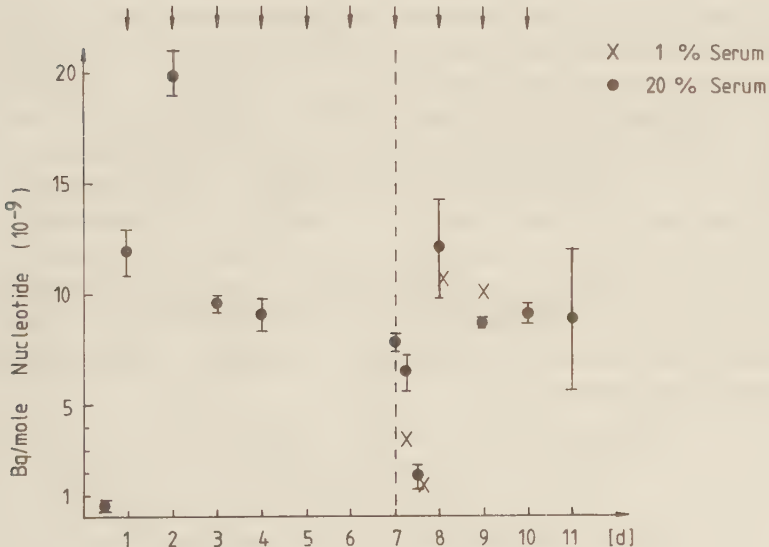


Fig. 3.23. Einbau von H-3dThd in die DNA von BHK 21 Zellen während des exponentiellen Wachstums. Das Wachstumsmedium mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd wurde täglich gewechselt ( $\downarrow$ ). Am siebten Tag nach dem Einpflanzen wurden die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen und nicht radioaktives Medium mit 1 % (X) und 20 % (●) 'newborn' Kälberserum wurde zugegeben. Jeder Punkt beim Einbau, bzw. beim Ausbau mit 20 % Serum repräsentiert den Mittelwert von 3 unabhängigen Messungen.

Es erscheint, daß die radioaktive Markierung fast vollständig aus der DNA ausgebaut ist. Nach 24 h ist bei beiden Serumkonzentrationen die spezifische Aktivität wieder auf das Ausgangsniveau angestiegen und nimmt während der nächsten drei Tage leicht ab. Im Gegensatz zum Einbau verlaufen die Kurven des Ausbaus bei 1 % und 20 % Serum gleich.

Bei einmaligem Wechsel des Wachstumsmediums (vgl. Fig 3.15.) geht die spezifische Aktivität nach 24 h nicht auf den Ausgangswert zurück. Dieser Unterschied kann allerdings nicht durch den täglichen Mediumwechsel erklärt werden, da innerhalb dieser 24 h kein Mediumwechsel erfolgt ist.

#### 3.5.2.4.3. Einbau ohne Mediumwechsel

Wenn eine durch den Mediumwechsel bedingte DNA-Synthese für den beobachteten Einbau von H-3dThd verantwortlich ist, so sollte ohne Mediumwechsel, nach eine Zugabe von H-3dThd zum 8 Tage alten Wachstumsmedium, kein Einbau in die DNA beobachtet werden. Wie die Ergebnisse für den Einbau ohne Mediumwechsel zeigen (Fig. 3.24.), ist dies aber nicht der Fall. Es ist weder ein Einbauppeak nach 6 h, noch ein Abfall nach 12 h zu beobachten ; der Einbau verläuft während der 24 h konstant. Die Einbaugeschwindigkeit ist geringer, nach 24 h sind nur ca. 40 % der Aktivität verglichen mit den Ansätzen mit Mediumwechsel eingebaut (im Ansatz ohne Mediumwechsel wurde eine zehnfach höhere H-3dThd-Konzentration verwendet).

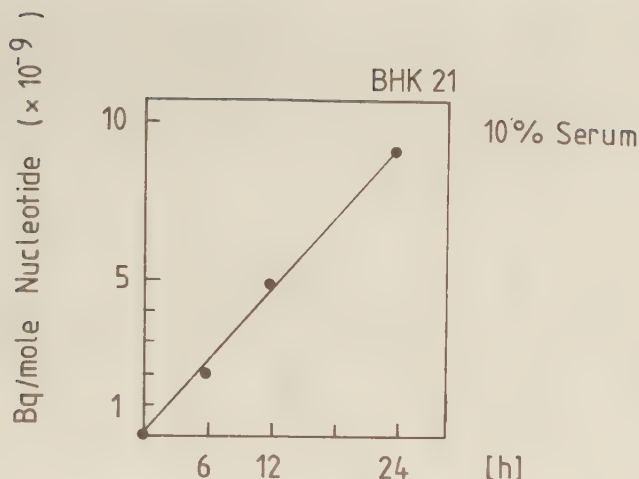


Fig. 3.24. Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen.  
Zum Zeitpunkt 0 (i.e. 8 Tage nach dem Einimpfen) wurden 3700 Bq/ml (0.1  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd dem Wachstumsmedium zugesetzt.

#### 3.5.2.4.4. Einbau über 24 h, Beobachtungen des Ausbaus

Die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen wurde für 24 h mit H-3dThd markiert und die Zellen anschließend in nicht radioaktivem Medium gehalten. Wenn der DNA-turnover auf bestimmte DNA-Regionen beschränkt bleibt, sollte während der Inkubation in nicht radioaktivem Medium die spezifische Aktivität der DNA entweder abnehmen, oder, bei einer vollständigen Wiederverwendung der Nukleotide durch den Salvagepathway, konstant bleiben.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Fig. 3.25. dargestellt; sie zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der spezifischen Aktivität der DNA während der Markierung für 24 h, und nach der Entfernung des radioaktiven Mediums eine leichte Abnahme der spezifischen Aktivität nach 6 h, sowie einen erneuten Anstieg nach 12 h.

Nach 12 h ist die spezifische Aktivität der DNA höher als während der Markierungsphase und steigt danach weiter an. Die Meßwerte sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen. Die angegebene Standardabweichung zeigt, daß die beobachteten Variationen außerhalb des Meßfehlers liegen.

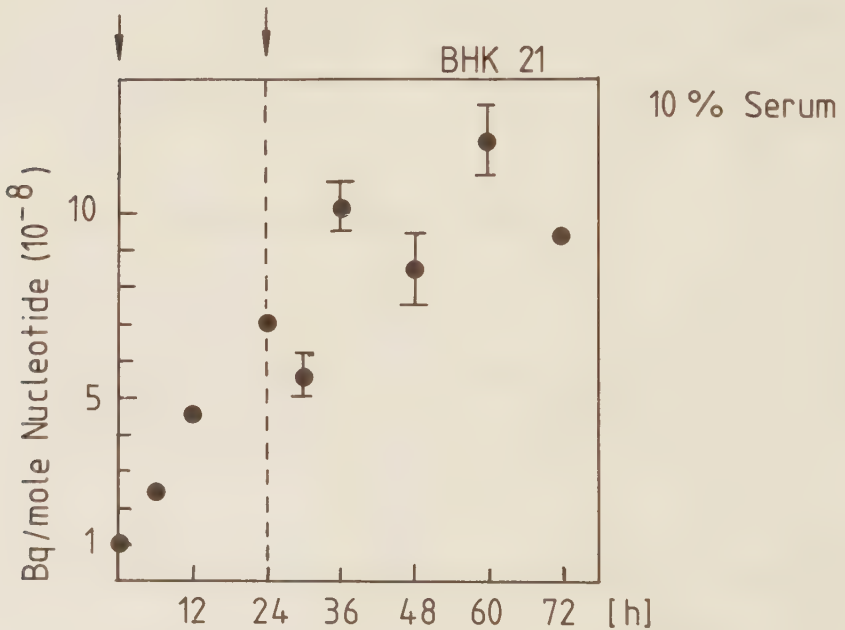


Fig. 3.25. Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. 8 Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium gewechselt ( $\downarrow$ ) und frisches Wachstumsmedium mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd wurde für 24 h zugegeben. Danach wurde das radioaktive Medium abgegossen ( $\downarrow$ ), die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen und frisches nicht radioaktives Wachstumsmedium wurde zugegeben. Die Punkte geben die Mittelwerte von drei unabhängigen Ansätzen an.

#### 3.5.2.4.5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse über den Einfluß des Mediumwechsels zeigen, daß der beobachtete Einbau von H-3dThd in die DNA, bzw. der Ausbau von H-3 aus der DNA von konfluenten Zellen nicht ausschließlich auf eine Stimulierung der DNA-Synthese durch den Mediumwechsel zurückgeführt werden kann, da ein Einbau auch ohne Mediumwechsel stattfindet und auch bei geringer Serumkonzentration ein Einbau, bzw. Ausbau beobachtet wird.

Die Zugabe von frischem Wachstumsmedium hat aber einen Einfluß auf die Dynamik und auf die Höhe des Einbaus. Dies kann durch die Entfernung von wachstumshemmenden Faktoren, die im verbrauchten Medium vorhanden sind, und durch die Zuführung von frischen Nährstoffen erklärt werden.

#### 3.5.2.5. Einbaukinetik in die DNA mit einer anderen markierten Vorstufe (D-[1-H-3]glucose)

Zum Nachweis, daß der beobachtete Verlauf des Einbaus von H-3dThd in die DNA, bzw. des Ausbaus aus der DNA nicht auf einen Artefakt durch die Markierung mit dThd zurückzuführen ist, wurde eine weitere markierte Vorstufe verwendet, die über einen andern Stoffwechselweg metabolisiert wird: D-[1-H-3]glucose.

Die Stoffwechselwege von H-3 von D-[1-H-3]glucose in die DNA sind in Figur 1.3. dargestellt. Die Kinetik des Einbaus von H-3 von H-3glucose in die DNA von konfluenten BHK 21, bzw. MRC-5 Zellen bei 0.5 % und 20 % Serum ist in Figur 3.26. bzw. 3.27. dargestellt. Der Verlauf des Einbaus unterscheidet sich teilweise vom Einbau von H-3dThd (Figur 3.14., 3.18.). Bei BHK 21 Zellen ist kein Einbauppeak innerhalb der ersten 24 h zu beobachten. Nach 24 h ist ein Gleichgewicht erreicht, wenn der Einbauppeak nach 72 h unberücksichtigt bleibt.

Bei MRC-5 Zellen ist nach 12 h ein Einbauppeak zu beobachten, und ebenfalls nach 24 h ist ein Gleichgewicht erreicht.

Wie beim Einbau von H-3dThd ist die spezifische Aktivität der DNA von BHK 21 Zellen höher. Bei beiden Zelllinien ist jedoch der Anteil der markierten DNA im Vergleich zur Markierung während des exponentiellen Wachstums geringer (Kap. 3.5.2.7.).

Labeled with D-[1-<sup>3</sup>H]Glucose

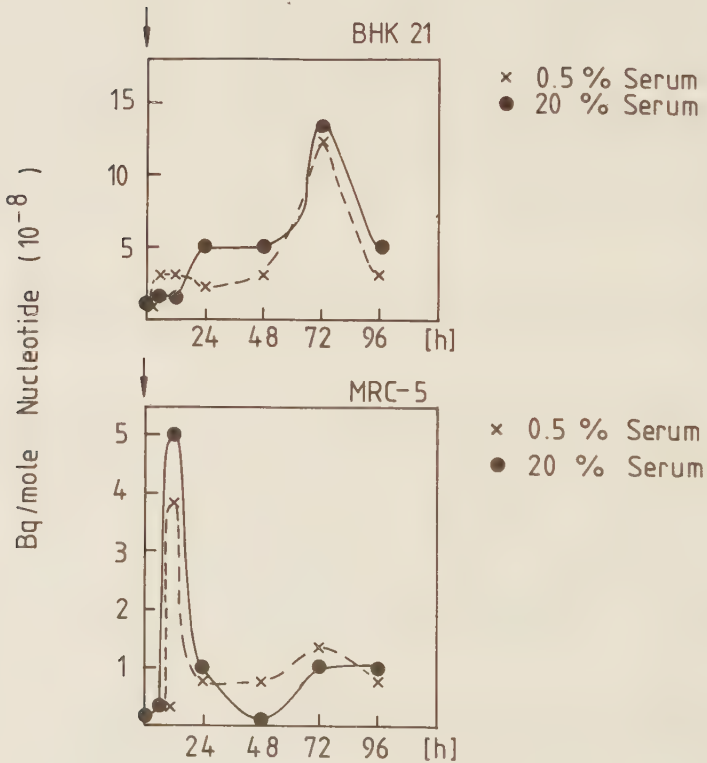


Fig. 3.26., 3.27. Einbau von H-3 in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen (Fig. 3.26.) und MRC-5 Zellen (Fig. 3.27.) bei 0.5 % (X) und 20 % (●) 'newborn' Kälberserum. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. acht Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium gewechselt (↓) und frisches Medium mit 18.5 KBq/ml (0.5 µCi/ml) D-[1-H-3]glucose wurde zugegeben.

Bei MRC-5 Zellen entspricht der Verlauf des Einbaus dem Einbau von C-14dThd in die DNA (Fig. 3.20., 3.21.), wobei eine zeitliche Verzögerung von 6 h auftritt. Diese Verzögerung ist auf den unterschiedlichen Metabolismus von dThd und Glucose zurückzuführen. dThd, das in die Zelle aufgenommen wird, gelangt nach der Phosphorylierung sofort in den Nukleotidpool, während Glucose zuerst über Glykolyse, bzw. über den oxidativen Pentose Phosphat Shunt metabolisiert werden muß, bevor Teile des Moleküls in den Nukleotidpool gelangen können. Dieser unterschiedliche Metabolismus zeigt sich auch im verringerten Einbau bei geringer Serumkonzentration. Bei geringer Serumkonzentration sind essentielle Nährstoffe nicht oder nur begrenzt vorhanden, wodurch die im L-15 Medium vorhandene Galaktose verstärkt abgebaut wird. Dies führt zu einer stärkeren Verdünnung der markierten Glucose während der Glykolyse.

#### 3.5.2.6. Einfluß von Hemmstoffen auf den beobachteten DNA-turnover

Um zu klären, ob der beobachtete Einbau, bzw. Ausbau auf replikative DNA-Synthese oder auf DNA-Reparatur zurückzuführen ist und zur Charakterisierung der beteiligten Enzyme, wurden verschiedene Hemmstoffe eingesetzt:

- (i) Arabincytosin - Hemmung der DNA-Polymerase  $\alpha$
- (ii) Dideoxythymidin - Hemmung der DNA-Polymerase  $\beta$
- (iii) Hydroxyharnstoff - Inhibitor der replikativen DNA-Synthese
- (iv) Novobiocin - Hemmung der eukaryontischen DNA-Topoisomerase, Typ II.

##### 3.5.2.6.1. Einfluß von Hydroxyharnstoff auf den Einbau bzw. Ausbau

Der Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen in Gegenwart von Hydroxyharnstoff (HU) ist in Figur 3.28. dargestellt. Durch Hydroxyharnstoff wird der Einbau innerhalb der ersten 6 h stark gehemmt, und nach 24 h ist ein Einbaupik zu beobachten. Nach 72 h ist die spezifische Aktivität der DNA

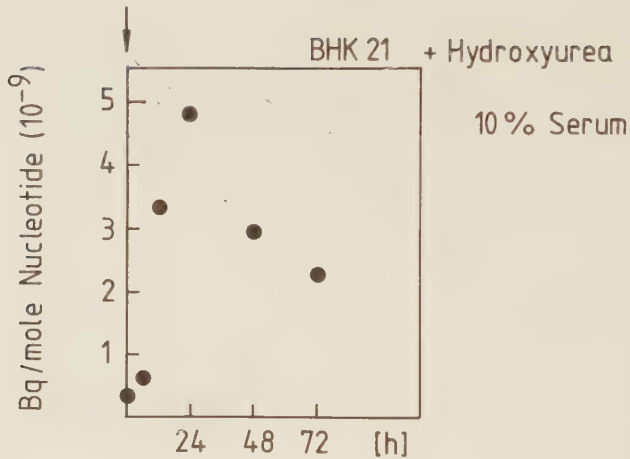


Fig. 3.28. Einbau von H-3 dThd in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen in Gegenwart von Hydroxyharnstoff. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. 8 Tage nach dem Einimpfen) wurde das Medium gewechselt ( $\downarrow$ ) und frisches Medium mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd und HCl (2 mM) zugegeben.

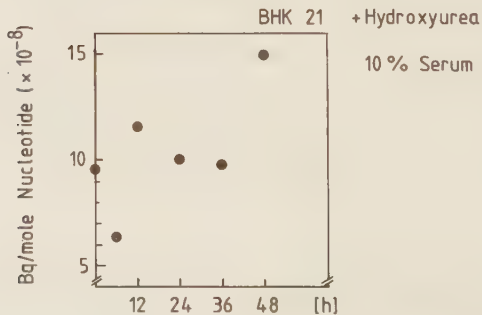


Fig. 3.29 Ausbau von H-3 aus der DNA in Gegenwart von Hydroxyharnstoff (2 mM). BHK 21 Zellen wuchsen in Wachstumsmedium mit 370 Bq/ml (0.01  $\mu$ Ci/ml) H-3dThd bis zur Konfluenz. Zum Zeitpunkt 0 (i.e. 8 Tage nach dem Einimpfen) wurde das Wachstumsmedium abgegossen, die Zellen zweimal mit PBS Puffer gewaschen und frisches Wachstumsmedium mit Hydroxyharnstoff zugegeben ( $\downarrow$ ).

sowohl im Ansatz mit HU, als auch im Ansatz ohne HU gleich (Fig. 3.14.). Hydroxyharnstoff sollte allerdings nur für kurzzeitige Untersuchungen verwendet werden, da es nach 24 h zu toxischen Effekten führen kann (Coyle und Strauss 1980). Der Ausbau von H-3 aus der DNA in Gegenwart von HU ist in Fig. 3.29. dargestellt. Im Gegensatz zum Einbau hat HU nach 6 h keinen hemmenden Effekt auf den Ausbau. Nach 36 h ist die spezifische Aktivität wieder auf das Ausgangsniveau zurückgegangen.

#### 3.5.2.6.2. Einfluß anderer Hemmstoffe

Der Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf den Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen wurde nach 4 h Inkubation der Zellen in radioaktivem Medium zusammen mit dem Hemmstoff bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tab. 3.9. zusammengestellt. Alle eingesetzten Hemmstoffe führten zu einer Hemmung des Einbaus von H-3dThd. Die Hemmung der DNA-Replikation, sowie die Hemmung der DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\beta$  lassen vermuten, daß sowohl replikative DNA-Synthese, als auch DNA-Reparatur an dem beobachteten DNA-turnover beteiligt sind. Überraschend ist die geringe Reduktion des Einbaus bei der Hemmung der DNA-Topoisomerase, da Topoisomerasen bei der DNA-Replikation und auch der DNA-Reparatur erforderlich sind.

| Hemmstoff        | Konzentration | was wird gehemmt                                | Einbau nach 4 h in % zur Kontrolle |
|------------------|---------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|
| Arabincytosin    | 1.0 $\mu$ M   | DNA-Polymerase $\alpha$                         | 42                                 |
| Dideoxythymidin  | 0.44 mM       | DNA-Polymerase $\beta$                          | 45                                 |
| Hydroxyharnstoff | 2.0 mM        | Ribonucleotid-diphosphatreduktase (DNA-Replik.) | 31                                 |
| Novobiocin       | 3.0 mM        | DNA-Topoisomerase                               | 88                                 |
| Kontrolle        |               |                                                 | 100                                |

Tab. 3.9. Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf den Einbau von H-3dThd in die DNA von konfluenten BHK 21 Zellen.

### 3.5.2.7. Abschätzung des Umfangs des beobachteten DNA-turnovers

Um den Anteil der markierten DNA von konfluenten Zellen abzuschätzen wurde ein Vergleich der spezifischen Aktivität der DNA, nach Markierung der gesamten DNA während des exponentiellen Wachstums, und der spezifischen Aktivität der DNA nach 24 h Markierung von konfluenten Zellen durchgeführt.

Für die verschiedenen Zelllinien sind die Ergebnisse in Tabelle 3.10. dargestellt. Wenn H-3dThd zur Markierung verwendet wird, scheint nach 24 h Markierung bei beiden Zelllinien etwa die Hälfte der DNA markiert, während bei D-[1-H-3]glucose nur ca. 25 % der DNA markiert ist.

Diese Werte sind mit einem großen Fehler behaftet und stellen die obere Grenze für eine Markierung durch DNA-turnover dar, da keine Korrektur für den durch replikative DNA-Synthese hervorgerufenen Einbau vorgenommen wurde.

### 3.5.2.8. Zusammenfassung

Die bisherigen Ergebnisse über den Einbau von H-3dThd in die DNA und den Ausbau aus der DNA von konfluenten, wachstumsinhibierten Zellen zeigen:

- (i) bei den drei Zelllinien BHK 21, CHO und MRC-5 wird in konfluentem Stadium H-3dThd in die DNA eingebaut,
- (ii) ebenso wird H-3, das während des exponentiellen Wachstums in die DNA eingebaut wurde, in konfluentem Stadium aus der DNA ausgebaut,
- (iii) diese Dynamik kann nur zum Teil durch Zellteilung und replikative DNA-Synthese erklärt werden, da
  - ein Einbau auch bei geringer Serumkonzentration stattfindet,
  - ein Einbau stattfindet, wenn das Wachstumsmedium nicht ausgetauscht wird,
  - der beobachtete Einbau (bzw. Ausbau) durch Hemmung der DNA-Replikation (Hydroxyharnstoff) reduziert aber nicht vollständig gehemmt werden kann.

Da die bisherigen Ergebnisse keine endgültige Aussage über den Umfang des DNA-turnovers erlauben, wurden zusätzliche Methoden, die eine genauere Charakterisierung der DNA erlauben und die die Ver-

| Zellen | Markiert mit | SA nach Markierung im exponentiellen Wachstum<br>[Bq/mol Nukleotid] | SA nach Markierung von konfluenten Zellen über 24 h<br>[Bq/mol Nukleotid] | Serumgehalt<br>[%] | Anteil der durch 'DNA-turnover' markierten DNA [%] |
|--------|--------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|
| BHK 21 | H-3dThd      | $4.2 \cdot 10^9$                                                    | $2.1 \cdot 10^9$                                                          | 20                 | 50                                                 |
|        |              |                                                                     | $2.3 \cdot 10^9$                                                          | 0.5                | 56                                                 |
|        | H-3glucose   | $2.0 \cdot 10^9$                                                    | $5.4 \cdot 10^8$                                                          | 20                 | 27                                                 |
|        |              |                                                                     | $2.3 \cdot 10^8$                                                          | 0.5                | 11                                                 |
| CHO    | H-3dThd      | $3.0 \cdot 10^9$                                                    | $1.5 \cdot 10^9$                                                          | 20                 | 50                                                 |
|        |              |                                                                     | $2.3 \cdot 10^9$                                                          | 1                  | 73                                                 |
| MRC-5  | H-3glucose   | $2.7 \cdot 10^9$                                                    | $9.3 \cdot 10^8$                                                          | 20                 | 34                                                 |
|        |              |                                                                     | $7.3 \cdot 10^8$                                                          | 0.5                | 27                                                 |

Tab. 3.10. Abschätzung des Anteils der DNA die durch DNA-turnover markiert wird. Der Anteil der am DNA-turnover beteiligten DNA wird berechnet durch den Vergleich der spezifischen Aktivität der während des exponentiellen Wachstums markierten DNA, mit der spezifischen Aktivität der während des konfluenten Stadiums markierten DNA. Es erfolgt keine Korrektur für den Anteil Zellen, die replikative DNA-Synthese durchführen.

teilung der Radioaktivität der einzelnen Zellen nachweisen, zur weiteren Untersuchung des DNA-turnovers eingesetzt.

### 3.5.3. Bestimmung des DNA-turnovers durch Dichtegradientenzentrifugation

Da die Betrachtung der spezifischen Aktivität keine Unterscheidung zwischen replikativer DNA-Synthese und DNA-Reparatur erlaubt, (Kap. 3.5.2.) wurden zusätzliche Methoden verwendet, die eine Unterscheidung zwischen replikativer DNA-Synthese und DNA-Reparatur ermöglichen.

Durch Dichtegradientenzentrifugation unter alkalischen Bedingungen

kann die neureplizierte DNA von der parentalen DNA getrennt werden, und durch Autoradiographie (Kap. 3.5.4.) kann der Anteil der radioaktiven Markierung auf Zellebene unterschieden werden. Da der Einbau nach 24 h nahezu abgeschlossen ist (Kap. 3.5.2.) wurde bei diesen Versuchen der Einbau nur über 8 h beobachtet.

#### 3.5.3.1. H-3BrdU Einbau mit Mediumwechsel

Bei konfluenten BHK 21 Zellen wurde das Medium gewechselt und die Zellen in Wachstumsmedium mit H-3BrdU (111 KBq/ml (3  $\mu$ Ci/ml)) für 4 bzw. 8 h inkubiert. Nach Extraktion wurde die DNA in einem CsCl-Gradienten unter alkalischen Bedingungen, getrennt.

Die Ergebnisse der CsCl-Gradientenzentrifugation der einzelnen Ansätze nach 4 h, 8 h, und 8 h (in Gegenwart von Hydroxyharnstoff) Inkubation sind in Figur 3.30. dargestellt.

Figur 3.30.A zeigt das Sedimentationsprofil der nicht radioaktiv markierten Kontrolle. Nach 4 h Inkubation (Figur 3.30.B) mit H-3 BrdU zeigt die parentale DNA (Absorbanzpeak) eine leichte Verschiebung in den Bereich höherer Dichte. Zusätzlich tritt eine stark radioaktiv markierte DNA (H-3 Peak) auf, die von der parentalen DNA getrennt werden kann. Dieser radioaktive Peak repräsentiert die neusynthetisierte DNA, i.e. Einbau via replikativer DNA-Synthese.

Nach 8 h Inkubation (Figur 3.30.C) werden die Peaks der neusynthetisierten DNA und der parentalen DNA breiter, und die Markierung ist stärker.

Nach 8 h Inkubation in Gegenwart von Hydroxyharnstoff (Figur 3.30.D) ist der radioaktive Einbau geringer, (die Skalen für die Radioaktivität sind unterschiedlich) und der Anteil an neusynthetisierter DNA ist geringer, so daß eine Trennung zwischen neusynthetisierter DNA und parentaler DNA möglich ist. Die parentale DNA zeigt einen deutlichen radioaktiven Peak, und eine leichte Verschiebung in den Bereich höherer Dichte.

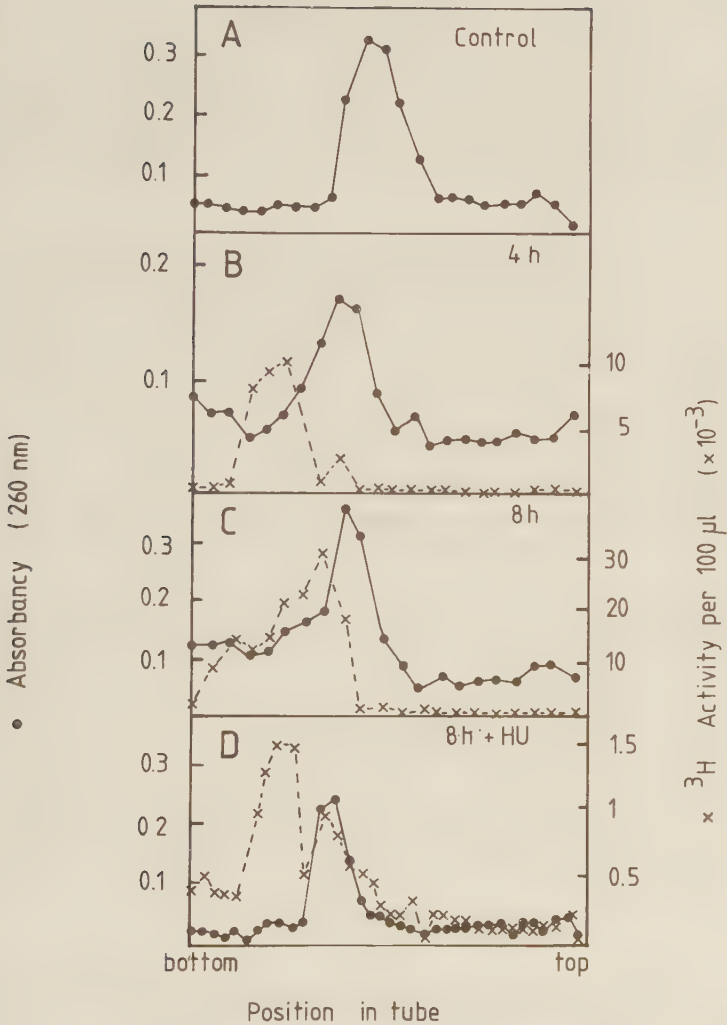


Fig. 3.30. Dichtegradientenzentrifugation der DNA von BHK 21 Zellen unter alkalischen Bedingungen. Am achten Tag nach dem Einimpfen wurde das Wachstumsmedium durch frisches mit H-3BrdU (111 KBq/ml) ersetzt. Nach 4 h (B), 8 h (C) und 8 h Inkubation mit Hydroxyharnstoff (2 mM) (D) wurden die Zellen trypsinisiert, die DNA extrahiert und in einem CsCl gradienten unter alkalischen Bedingungen getrennt.

#### 3.5.3.2. H-3BrdU Einbau ohne Mediumwechsel

Der Einbau von H-3BrdU (185 KBq/ml) in die DNA von BHK 21 Zellen am achten Tag nach dem Einimpfen wurde ohne Mediumwechsel untersucht. Die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation der DNA nach 4 h und 8 h Inkubation mit H-3BrdU sind in Fig. 3.31. dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen das Sedimentationsprofil der unmarkierten DNA (A). Nach 4 h Inkubation mit H-3BrdU (B) zeigt die parentale DNA (Absorbanzpeak) eine leichte radioaktive Markierung und eine leichte Verschiebung in den Bereich höherer Dichte. Zusätzlich kann eine stark markierte DNA (H-3 Peak) von der parentalen DNA getrennt werden. Nach 8 h Inkubation (C) ist der H-3 Peak der neusynthetisierten DNA breiter, und die spezifische Aktivität der parentalen DNA ist höher als nach 4 h Inkubation.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei konfluenten BHK 21 Zellen, acht Tage nach dem Einimpfen, noch replikative DNA-Synthese stattfindet.

Die Überschneidung des radioaktiven Peaks und des Absorbanzpeaks erlauben keine deutliche Trennung zwischen parentaler und neusynthetisierter DNA, da bei 4 bzw. 8 h Inkubation nur wenige Zellen während der gesamten S-Phase (Dauer ca. 6 h) markiert werden, und eine Überschneidung beider Peaks somit durch nicht vollständig replizierte DNA erklärt werden kann, die im Bereich mittlerer Dichte sedimentiert. Trotzdem ist eine Markierung der parentalen DNA erkennbar, da sie mit H-3 markiert ist und im Bereich höherer Dichte sedimentiert.

#### 3.5.3.3. Abschätzung des Anteils der durch DNA-turnover markierten DNA

Durch die CsCl-gradienten Zentrifugation kann der neusynthetisierte DNA-Strang vom parentalen DNA-Strang getrennt werden. Die Überschneidung beider DNA-Stränge durch replizierende DNA macht es schwierig, den genauen Anteil der durch DNA-turnover markierten DNA zu bestimmen. Dieses erfolgte durch einen Ver-

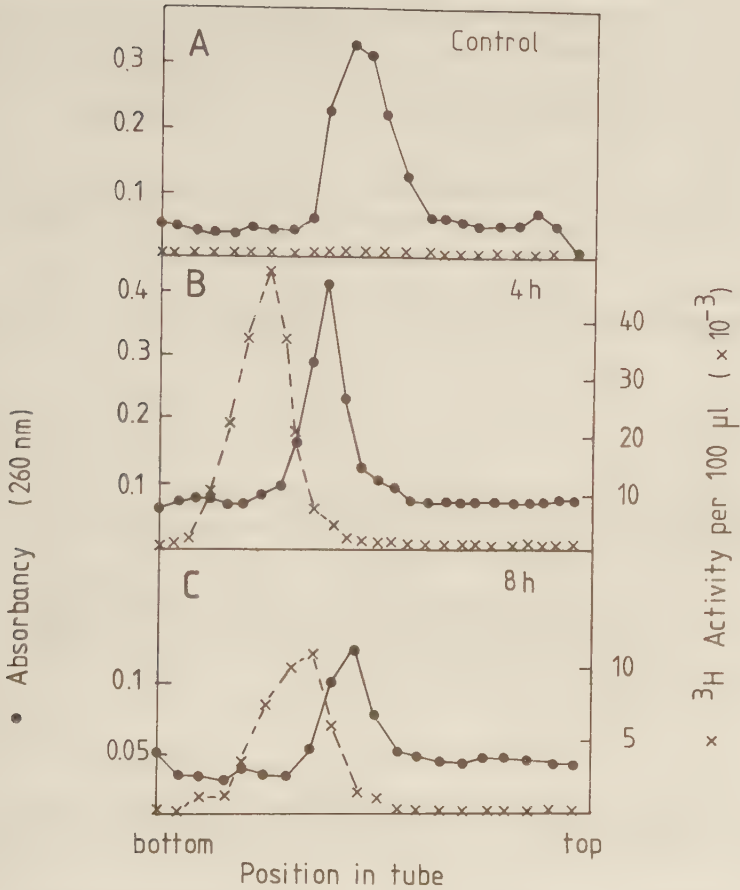


Fig. 3.31. Dichtegradientenzentrifugation der DNA von BHK 21 Zellen unter alkalischen Bedingungen.  $\text{H-}^3\text{BrdU}$  wurde direkt zu dem acht Tage alten Wachstumsmedium (Endkonzentration 185 KBq/ml) zugegeben und nach 4 h (B) und 8 h (C) Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  die Zellen trypsiniert, die DNA extrahiert und in einem  $\text{CsCl}$ -Gradienten unter alkalischen Bedingungen getrennt.

gleich der Radioaktivität des neusynthetisierten und des parentalen, durch DNA-turnover markierten DNA-Strangs. Die Radioaktivität in den beiden DNA-Strängen wurde im Überschneidungsbereich bis zur Basislinie extrapoliert und dem jeweiligen DNA-Strang zugeordnet. Die Fläche der Peaks wurde durch Abwiegen bestimmt (Fig. 3.30. und 3.31.). Die Ergebnisse sind in Tab. 3.11. dargestellt.

| Kulturbedingungen | Inkubationszeit<br>[h] | Anteil DNA-turnover <sup>1)</sup><br>Gesamteinbau |       |
|-------------------|------------------------|---------------------------------------------------|-------|
|                   |                        | [%]                                               | [%]/h |
| MW                | 8                      | 4                                                 | 0.5   |
| MW + HU           | 8                      | 44                                                | 5.5   |
| kein MW           | 8                      | 6                                                 | 0.75  |

<sup>1)</sup> Der durch DNA-turnover markierte DNA-Anteil wurde durch einen Vergleich der Radioaktivität der neusynthetisierten mit der parentalen DNA bestimmt.

Tab. 3.11. Abschätzung des durch DNA-turnover markierten DNA-Anteils nach Trennung der DNA im CsCl-Gradienten. Die Fläche der Radioaktivität (vgl. Fig. 3.30. und 3.31.) der neusynthetisierten und parentalen DNA wurde durch Wiegen bestimmt.

MW = Mediumwechsel

#### 3.5.4. Nachweis des DNA-turnovers bei BHK 21 Zellen durch Autoradiographie

Durch Trennung der H-3-BrdU markierten DNA im CsCl-Gradienten wurde bei konfluenten BHK 21 Zellen neusynthetisierte DNA und eine Markierung der parentalen DNA beobachtet (Kap.3.5.3.). Zur genaueren Charakterisierung des Einbaus auf Zellebene erfolgte eine autoradiographische Auswertung der Zellen. Vor der DNA-Extraktion wurden einige Zellen fixiert, auf Objektträger aufgetragen und für die Autoradiographie weiterbehandelt.

#### 3.5.4.1. Einbau mit Mediumwechsel

Die Auswertung der Autoradiogramme für die Ansätze mit Mediumwechsel sind in Fig. 3.32. dargestellt.

Mit Ausnahme der Kontrollen lassen sich bei allen Autoradiogrammen schwach und stark markierte Zellen ( $> 100$  Silberkörner) unterscheiden. Da bei den stark markierten Zellen die Schwärzung im Sättigungsbereich lag, kann die genaue Zahl der geschwärzten Silberkörner pro Zelle nicht exakt bestimmt werden, weshalb nur der Anteil stark markierter Zellen bestimmt wurde. Es wird davon ausgegangen, daß diese stark markierten Zellen diejenigen sind, die replikative DNA-Synthese durchführen, bzw. durchgeführt haben.

Nach dem Mediumwechsel und 4 h Markierung mit H-3BrdU ist im Vergleich zur Kontrolle bei allen Zellen eine höhere Anzahl von Silberkörnern zu erkennen (B). Zusätzlich sind 16 % der Zellen stark markiert, d.h. diese Zellen führen replikative DNA-Synthese durch. Nach 8 h Markierung (C) ist beides, die Anzahl der Silberkörner pro Zelle bei den schwach markierten Zellen und der Anteil der Zellen, die replikative DNA-Synthese durchführen (25 %), angestiegen. Durch Hydroxyharnstoff (D) wird sowohl die Anzahl der Silberkörner pro Zelle bei den schwach markierten Zellen, als auch der Anteil der Zellen, die replikative DNA-Synthese durchführen (8%), reduziert.

Diese Beobachtung zeigt, daß HU die DNA-Replikation nicht vollständig hemmt, und daß auch die Prozesse, die hier unter dem Begriff DNA-turnover zusammengefaßt werden, durch HU beeinflusst werden.

#### 3.5.4.2. Einbau ohne Mediumwechsel

Die Auswertung der einzelnen Autoradiogramme für die Ansätze ohne Mediumwechsel sind in Fig. 3.33. dargestellt.

Nach 4 h Inkubation (B) sind 10 % der Zellen stark markiert, die restlichen Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Markierung. Nach 8 h Inkubation (C) ist der Anteil der stark markierten Zellen nur leicht höher (11 %), während die restlichen

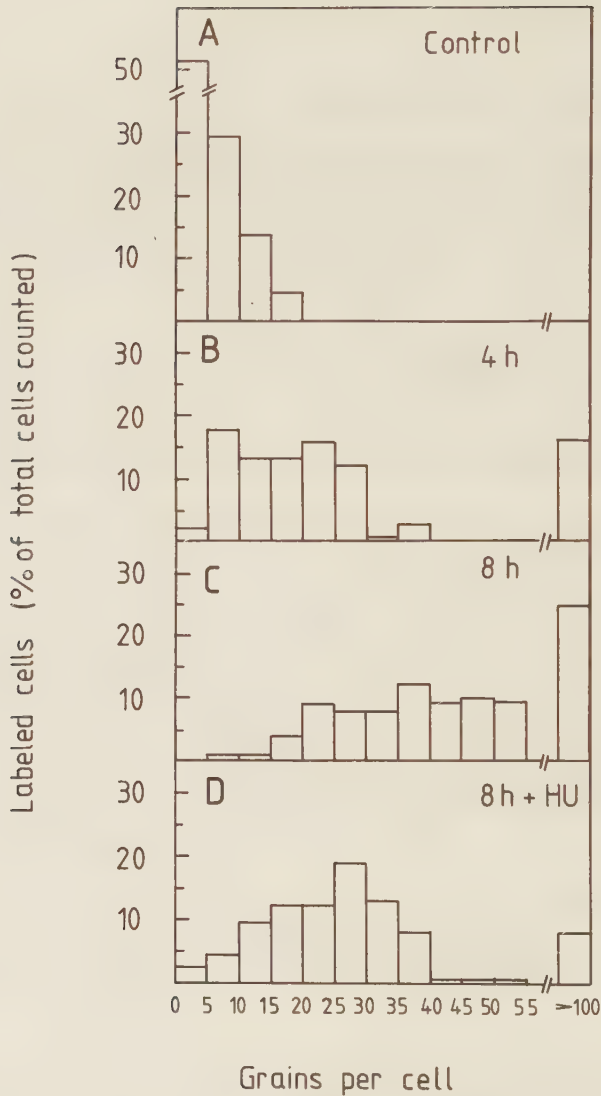


Fig. 3.32. Häufigkeitsverteilung der ausgezählten Silberkörner pro Zelle nach fünfwöchiger Expositionszeit. Am achten Tag nach dem Einimpfen wurde das verbrauchte Wachstumsmedium durch frisches mit H-3BrdU (111 Bq/ml) ersetzt und nach 4 h (B), 8 h (C) und 8 h plus Hydroxyharnstoff (2mM) (D) die Zellen trypsinisiert und fixiert. Die Autoradiogramme wurden wie in Kap. 2.5. beschrieben behandelt und die Anzahl der Silberkörner pro Zelle mikroskopisch ausgezählt.

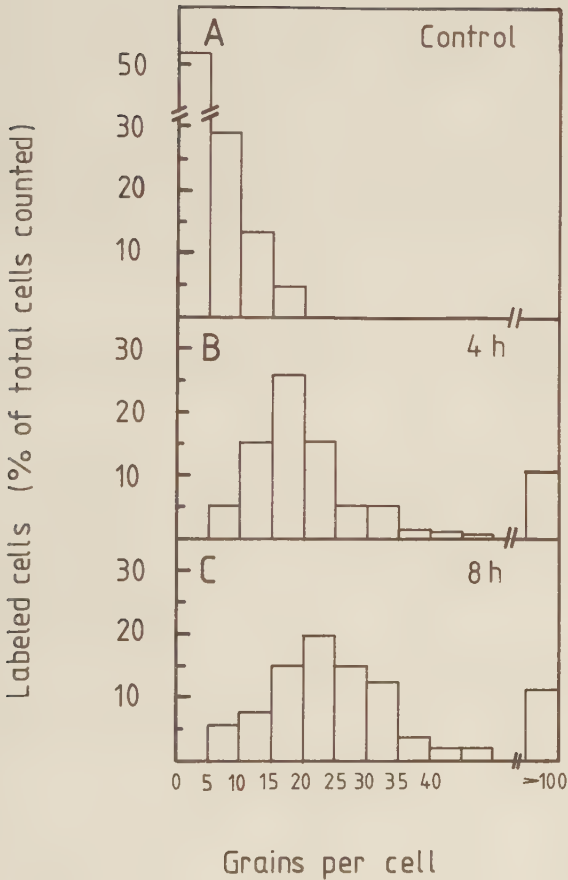


Fig. 3.33. Häufigkeitsverteilung der ausgezählten Silberkörner pro Zelle nach 5 wöchiger Expositionszeit. H-3BrdU wurde direkt zu dem acht Tage alten Wachstumsmedium (Endkonzentration 185 KBq/ml) zugegeben. Nach 4 h (B) bzw. 8 h (C) Inkubation wurde die Zellen tryptisiert und fixiert. Die Behandlung der Autoradiogramme ist in Kap. 2.5. beschrieben. Pro Ansatz wurden mehr als 100 Zellen mikroskopisch ausgewertet.

Zellen eine leichte Zunahme der Markierung zeigen.

Die Markierung der Zellen der beiden Ansätze mit und ohne Mediumwechsel können nicht direkt miteinander verglichen werden, da bei dem Ansatz ohne Mediumwechsel eine höhere H-3BrdU Konzentration (185 KBq/ml) eingesetzt wurde. Die H-3BrdU Konzentration in den Ansätzen mit Mediumwechsel betrug 111 KBq/ml. Ein Vergleich des Einbaus nach 8 h Inkubation zeigt beim Ansatz ohne Mediumwechsel, trotz der höheren H-3BrdU Konzentration eine insgesamt geringere Markierung der Zellen, so daß vermutet werden kann, daß z.B. der verminderte Gehalt an essentiellen Nährstoffen im acht Tage alten Medium einen Einfluß auf die Markierung der Zellen hat.

#### 3.5.4.3. Abschätzung des Anteils der durch DNA-turnover markierten DNA

Die Bestimmung des genauen Anteils der durch DNA-turnover markierten DNA auf Grund der Ergebnisse der Autoradiographie ist schwierig, da die Silberkornzahl der stark markierten Zellen nicht exakt bestimmt werden kann. Ein Vergleich der Silberkornzahl der schwach markierten Zellen mit einer geschätzten Silberkornzahl von 350 pro stark markierter Zelle zeigt, daß die Markierung der schwach markierten Zellen 4 - 9 % der der stark markierten Zellen beträgt, und daß der Anteil der durch DNA-turnover markierten DNA 20 - 39 % des Gesamteinbaus beträgt. (Tab. 3.12.).

| Markierungs-<br>bedingung | H-3BrdU<br>[ $\mu$ Ci/ml] | Inkubations-<br>dauer<br>[h] | Stark markier-<br>te Zellen<br>[%] | Schwach mar-<br>kierte Zel-<br>len<br>[%] | Körner<br>pro<br>schwach<br>markierte<br>Zelle | Körner<br>schwach<br>mark.<br>stark<br>mark. | Anteil<br>der durch<br>DNA-turn-<br>over mar-<br>kierten DNA<br>[%] |
|---------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| MW                        | 3                         | 8                            | 25.0                               | 75.0                                      | 30                                             | 0.09                                         | 20                                                                  |
| MW + HU                   | 3                         | 8                            | 8.1                                | 91.9                                      | 20                                             | 0.06                                         | 39                                                                  |
| kein MW                   | 5                         | 8                            | 11.4                               | 88.6                                      | 15                                             | 0.04                                         | 25                                                                  |

1) Die durchschnittliche Kornzahl pro schwach markierter Zelle wurde berechnet, und der Backgroundwert subtrahiert

2) Die Silberkornzahl pro stark markierter Zelle kann nicht exakt bestimmt werden, da die Schwärzung im Sättigungsbereich liegt. Es werden  $\sim 350$  Silberkörner pro stark markierter Zelle zu Grunde gelegt.

Tab. 3.12. Abschätzung der am DNA-turnover beteiligten DNA auf Grund der Ergebnisse der Autoradiographie. (MW = Mediumwechsel)

### 3.5.5. Zusammenfassung

DNA-turnover wurde an konfluenten Zellen untersucht, durch:

- (i) die Analyse der spezifischen Aktivität nach Einbau von H-3dThd in die DNA,
- (ii) CsCl-Gradienten Zentrifugation nach Markierung der DNA mit H-3BrdU, und
- (iii) Autoradiographie.

Alle eingesetzten Methoden zeigen eine Markierung der DNA von konfluenten Zellen, die hauptsächlich auf replikative DNA-Synthese zurückgeführt werden kann. Durch CsCl-Zentrifugation der markierten DNA und durch Autoradiographie kann eine Markierung der parentalen DNA, bzw. eine Markierung aller Zellen nachgewiesen werden, die durch DNA-turnover erklärt werden kann.

Der berechnete Anteil der am DNA-turnover beteiligten DNA ist bei den einzelnen Methoden unterschiedlich.

### 3.6. Immobilisierte Zellen als stationäres System

Da konfluente Zellen auch bei geringer Serumkonzentration kein geeignetes stationäres System darstellen, wurden BHK 21 Zellen in Alginat immobilisiert und die Stationarität dieses Systems anhand verschiedener Parameter untersucht.

Die Parameter Zellzahl, Glucose 6-Phosphat-DeHydrogenase Aktivität, DNA-Gehalt pro Zelle und der Einbau von H-3dThd während einer 4 h Pulsmarkierung wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Immobilisierung untersucht und sind in Figur 3.34. dargestellt. Während der ersten 5 Tage nach der Immobilisierung verdoppelt sich die Zellzahl, und bleibt danach relativ konstant (Fig. 3.34.A). Dieser Anstieg der Zellzahl korreliert mit der Zunahme der G 6-PDH Aktivität (Fig. 3.34.B).

Der DNA-Gehalt pro Zelle von 13 - 15 pg während der ersten 5 Tage nach der Immobilisierung (Fig. 3.34.C) zeigt, daß ein großer Teil der Zellen nicht in G<sub>1</sub>-Phase ist, sondern replikative DNA-Synthese durchführt. Erst nach 22 Tagen geht der DNA-Gehalt pro Zelle auf einen, der G<sub>1</sub>-Phase entsprechenden Wert zurück.

Die Pulsmarkierung (Fig. 3.34.D) zeigt die Viabilität der Zellen während der gesamten Dauer des Experiments. Der Einbau von H-3dThd direkt nach der Immobilisierung ist auf replikative DNA-Synthese zurückzuführen. Dies ist an der Zunahme der Zellzahl, der erhöhten G 6-PDH Aktivität und dem hohen DNA-Gehalt direkt nach der Immobilisierung erkennbar.

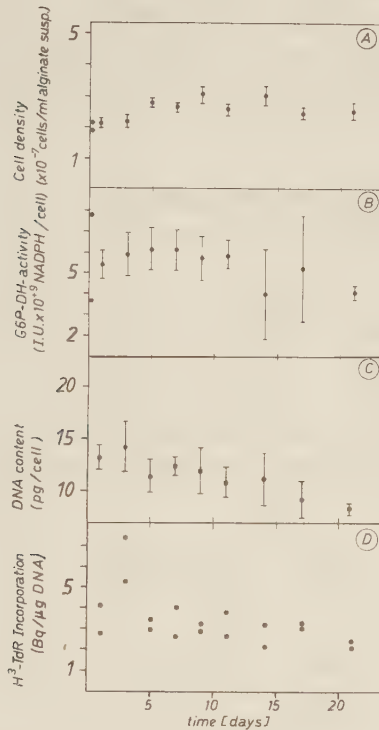


Fig. 3.34. Zellzahl (A), Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität (B), DNA-Gehalt pro Zelle (C) und H-3dThd Einbau nach 4 h Pulsmarkierung (D) bei BHK 21 Zellen zu verschiedenen Zeiten nach der Immobilisierung in Alginat.

Um zu klären, ob der Einbau nach 20 oder 30 Tagen noch auf replikative DNA-Synthese oder DNA-turnover zurückzuführen ist, wurde der Einbau von H-3BrdU in die DNA von immobilisierten Zellen zu verschiedenen Zeiten nach der Immobilisierung untersucht.

Die immobilisierten Zellen wurden direkt, bzw. 20 Tage nach der Immobilisierung für 20 h in Medium mit 55.5 KBq/ml (1.5 µCi/ml) inkubiert. Am dreißigsten Tag nach der Immobilisierung wurden die Zellen mit nicht radioaktivem BrdU (6 µg/ml) ebenfalls für 20 h inkubiert; anschließend die Alginatpartikel aufgelöst, die DNA der Zellen extrahiert und unter alkalischen Bedingungen in einem CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert. Die Dichte der DNA ohne Markierung (Kontrolle) und der Einbau von BrdU direkt und 20 bzw. 30 Tage nach der Immobilisierung sind in Fig. 3.35. dargestellt.

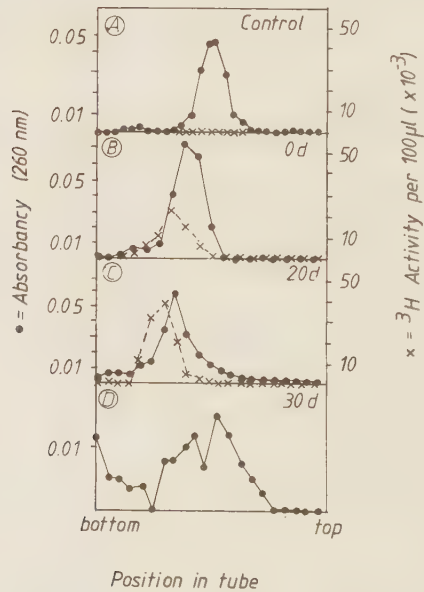


Fig. 3.35. CsCl-Gradientenzentrifugation der BrdU markierten DNA von immobilisierten BHK 21 Zellen unter alkalischen Bedingungen. Direkt nach der Immobilisierung (B) und 20 Tage nach der Immobilisierung (C) wurden die DNA mit H-3BrdU (55 KBq/ml, 20 h), 30 Tage nach der Immobilisierung mit BrdU (6 µg/ml) (D) markiert, die DNA extrahiert und in einem CsCl-Gradienten getrennt.

Direkt nach der Immobilisierung (Fig. 3.35.B) wurde H-3BrdU in die DNA eingebaut und beides, der Tochterstrang und die parentale DNA markiert. Die Markierung am 20. Tag nach der Immobilisierung (C) zeigt dies deutlicher. Der Einbau von nicht radioaktivem BrdU am 30. Tag nach der Immobilisierung (D) zeigt, daß die Zellen auch zu dem Zeitpunkt noch replikative DNA-Synthese durchführen und daß unter diesen Bedingungen auf eine radioaktive Markierung der DNA verzichtet werden kann.

Wie bei konfluenten BHK 21 Zellen (3.2.) ist bei immobilisierten Zellen nach Markierung mit H-3BrdU eine Verschiebung der parentalen DNA in den Bereich höherer Dichte zu beobachten (Fig. 3.35.B,C). Bei Verwendung von BrdU wird diese Verschiebung nicht beobachtet, obwohl eine Markierung des Tochterstrangs stattfindet. Diese nicht näher untersuchte Beobachtung kann auf eine unterschiedliche Selektivität der am DNA-turnover und DNA-Replikation beteiligten Enzyme zurückgeführt werden. Bei E.coli ist eine Selektivität beim Einbau von Thymin gegenüber BrdU bekannt (Smith et al. 1981).

### 3.6.1. Zusammenfassung

Immobilisierte Zellen zeigen auch noch am 30. Tag nach der Immobilisierung replikative DNA-Synthese und sind somit kein vollständig stationäres System. Auch in diesem System wurde DNA-turnover beobachtet.

#### 4. Diskussion

##### 4.1. Zellschädigung durch Trypsin und andere proteolytische Enzyme

Beim Ablösen von konfluenten BHK 21 Zellen mit 'crude' oder kristallinem Trypsin, kollagenase, Pronase E und Dispase wurden irreversible und reversible Zellschäden beobachtet. Während der Inkubation der Zellen in den verschiedenen Enzymlösungen nach dem Ablösen verringerte sich die Zellzahl kontinuierlich und ein hoher Anteil der Zellen war permeabilisiert.

Irreversible Zellveränderungen wurden bei allen untersuchten Enzymen beobachtet und mit zwei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen:

- durch einen Vergleich des DNA-Gehalts pro gezählter Zelle nach enzymatischer Behandlung mit dem DNA-Gehalt pro Zelle bei nicht enzymatisch abgelösten Zellen (Lymphozyten, immobilisierte Zellen, isolierte Kerne) (Tab. 3.2.)
- durch die Bestimmung des Desoxy-H-3-glucose Gehalts nach dem Waschen der ungeschädigten Zellen durch Zentrifugation (Fig. 3.5.).

Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse. Bei 'crude' und kristallinem Trypsin wurden 40 - 45 % der Zellen beim Ablösen lysiert und bei Pronase E und Dispase 65 %, bzw. 69 %.

Reversible Zellschädigung, Permeabilisierung der Zellen durch die enzymatische Behandlung, wurde durch die Aufnahme von Trypanblau bestimmt. Diese Permeabilisierung der Zellen ist reversibel, da:

- Bei der Inkubation der Zellen in der Enzymlösung nach dem Ablösen (Fig. 3.2.) nimmt der Anteil der permeabilisierten Zellen schneller ab als die Zellzahl. Dies zeigt: nicht alle permeabilisierten Zellen lysieren, und einige Zellen sind in der Lage, diese Schäden zu reparieren.
- Bei der Inkubation der trypsinierten Zellen in PBS Puffer (Fig. 3.2. Kontrolle) bleibt die Zellzahl konstant, während der Anteil an permeabilisierten Zellen ständig abnimmt. Unter diesen Bedingungen sind nahezu alle Zellen in der Lage, sich von den Schäden zu erholen.

Die irreversiblen und reversiblen Veränderungen können auf eine Schädigung der Plasmamembran durch die proteolytischen Enzyme zurückgeführt werden. Durch die Trypsinbehandlung verändert sich die Morphologie der Plasmamembran, Bläschen (Blebs) werden gebildet und die Zellen runden sich ab (Revel et al. 1974, Whur et al. 1977, Furcht und Wendelschafer-Crabb 1978, Vogel 1978, Raizada et al. 1981). Die gleichen morphologischen Veränderungen wurden nach der Permeabilisierung von Monolayer Zellen durch Lysolecithin beschrieben (Balinska et al. 1982), obwohl Lysolecithin nicht mit den Proteinen, sondern mit den Lipiden der Plasmamembran wechselwirkt.

Nach Trypsinbehandlung ist ein reversibler Verlust von Membranproteinen (Juliano und Gagalang 1977) und von Glucosamin enthaltenden Komponenten (Kraemer 1967, Onodera und Sheinin 1970) beschrieben.

Das schlechte Ablösen der Zellen bei Verwendung von Kollagenase, und die geringe Zellyse während der Inkubation in Kollagenase (Fig. 3.2.) kann durch die Existenz einer extrazellulären filamentösen Matrix erklärt werden, die durch Trypsin, aber nicht Kollagenase abgebaut wird (Furcht et al. 1978). Ebenso kann die unterschiedliche Dauer bis zum Ablösen der Zellen nach Enzymzugabe und der variable Grad der Schädigung auf die unterschiedliche Größe und Beschaffenheit dieser extrazellulären Matrix zurückgeführt werden.

#### 4.1.1. Intrazelluläre Wirkung

Nach Trypsinbehandlung wurde Trypsin in den Zellen nachgewiesen (Hodges et al. 1973) und es ist anzunehmen, daß intrazelluläres Trypsin für die beschriebenen Veränderungen der zytoplasmatischen Bestandteile und des Zellkerns verantwortlich ist (Furcht und Wendelschafer-Crabb 1978, Raizada et al. 1981). Wie Trypsin in die Zellen gelangt ist nicht geklärt. Die Aufnahme kann über Endozytose erfolgen oder durch Penetration der permeabilisierten Membran. Die Bindung von Trypsin an einen Protease Inhibitor wie Protease-Nexin und Internalisierung dieses Komplexes über

Nexin-Rezeptoren scheint für die beobachteten Effekte nicht von Bedeutung zu sein, da der Protease-Nexin-Komplex keine proteolytische Aktivität zeigt (Knauer und Cunningham 1984). Es ist zu vermuten, daß durch intrazelluläre Proteasen eine zunehmende Schädigung der Zellen erfolgt,

#### 4.1.2. Zellveränderung nach Behandlung mit proteolytischen Enzymen

Eine zweiminütige Inkubation der Zellen in der Enzymlösung führt noch nicht zu einer Permeabilisierung und Lyse der Plasmamembran, da z.B. keine Freisetzung von Desoxy-H-3-glucose während dieser Zeit beobachtet wurde. Wenn die Zellen in der Kulturflasche mit proteolytischen Enzymen ohne mechanischen Einfluß bei 37° C inkubiert wurden, war mikroskopisch während einer 17 minütigen Inkubation keine Zellyse zu beobachten. Zellyse ist bei hohen Trypsinkonzentrationen ( $> 0.25$  mg/ml) beschrieben worden (Whur et al. 1977). Die Zellen werden nicht direkt durch die enzymatische Behandlung lysiert, aber die Gestalt und die Plasmamembran werden verändert. Es bilden sich Bläschen (Blebs) und die Zellen runden sich ab.

Während der Inkubation in der Enzymlösung werden diese Bläschen (Blebs) größer (Furcht und Wendelschafer-Crabb 1978) und es kann angenommen werden, daß die durch Elektronenmikroskopie nachgewiesenen Bläschen (Blebs) sich weiter ausdehnen und zu den großen Bläschen (Blebs) werden, die nach längerer Inkubation in der Enzymlösung im Phasenkontrast beobachtet werden (Fig. 3.3.A,B). In diesem Stadium ist die Plasmamembran verändert, aber noch nicht zerstört und kann durch mechanische Kräfte (z.B. Pipettieren) leicht zerstört werden. Diese Vorgänge sind in Fig. 4.1. skizziert. Deshalb lysieren die Zellen erst beim Überführen aus der Kulturflasche, und die Zellyse kann nicht direkt nachgewiesen werden. Auf Grund ihrer Lipophilizität bilden die Bläschen (Blebs) und die anderen Bestandteile der Plasmamembran direkt nach der Zellyse Lipidpartikel. Es ist beschrieben, daß zytoplasmatische Bestandteile wie Lysosomen, Ribosomen, Endoplasmatisches Retikulum und Mito-

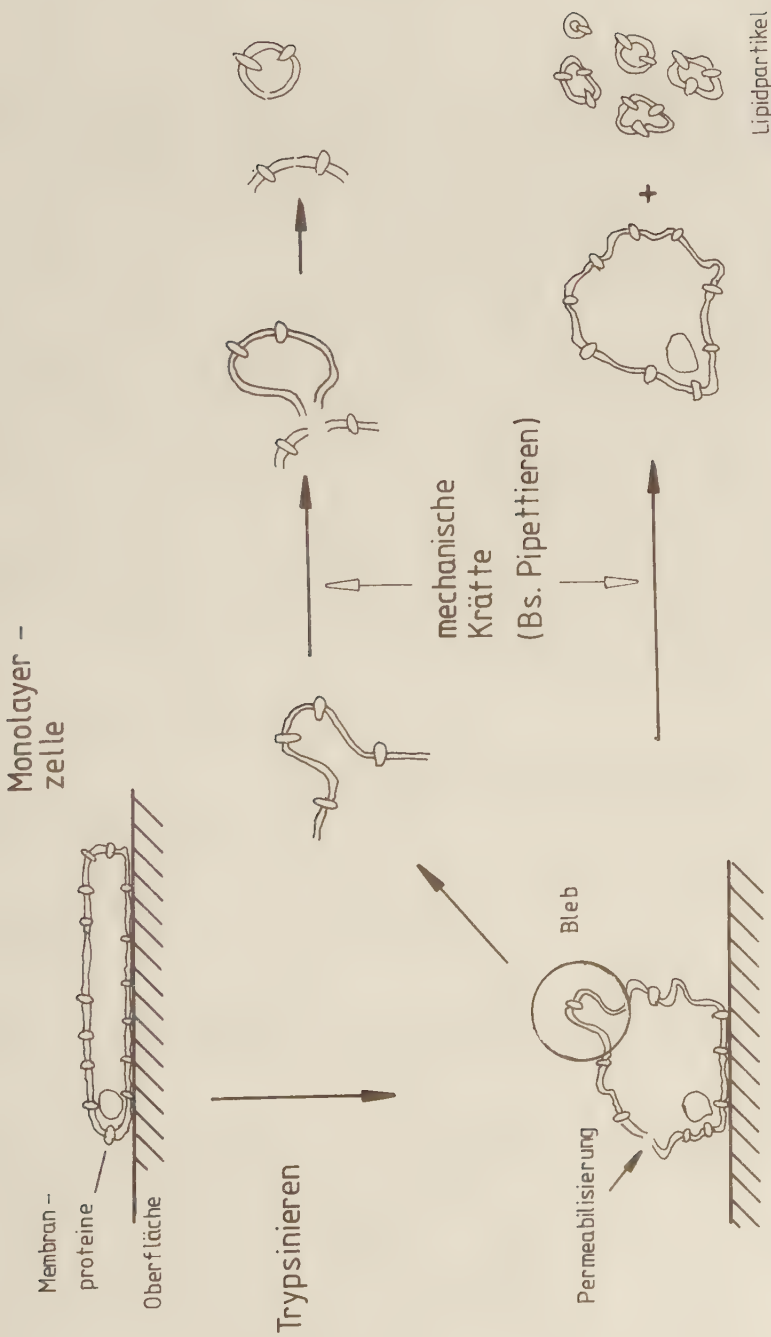


Fig. 4.1. Schematische Darstellung der Vorgänge beim Trypsinieren von Monolayer Zellen

Die Zellen runden sich ab und bilden Ausstülpungen der Zellmembran die durch mechanische Kräfte (z.B. Pipettieren) abgelöst werden.

chondrien in die Bläschen (Blebs) eingeschlossen werden (Furcht und Wendelschafer-Crabb 1978).

Die Lipidpartikel sedimentieren nicht mit den in der DNA-Matrix eingeschlossenen Zellen und können durch Zentrifugieren von der DNA-Matrix und den Zellen getrennt werden. Der große Unterschied zwischen G 6-PDH Aktivität (Fig. 3.4.) und Desoxy-H-3-glucose Aktivität (Fig. 3.5.) ist dadurch zu erklären, daß fast alle cytoplasmatischen Bestandteile in den Lipidpartikeln eingeschlossen sind. Deshalb ist die G 6-PDH Aktivität im nicht mit einem Detergenz behandelten Überstand gering. Im Gegensatz dazu werden die Lipidpartikel bei der Bestimmung des Desoxy-H-3-glucose Gehalts in der Scintillationslösung zerstört, und die Desoxy-H-3glucose Aktivität kann ohne Probleme bestimmt werden.

Die Beobachtung, daß ein hoher Anteil der Zellen beim Ablösen irreversibel geschädigt wird, ist nicht nur für Experimente bei Monolayer Zellen von Bedeutung, wenn die exakte Zellzahl bestimmt werden muß, sondern hat auch weiterreichende Konsequenzen (Kap. 4.3) (Dittmer et al. 1984, Zipfel et al. 1984).

#### 4.2. Aufnahme und Integration exogener DNA

Die von den lysierten Zellen freigesetzte DNA kann von den restlichen Zellen aufgenommen und in das Genom integriert werden. Die Existenz derartiger Mechanismen wurde durch die Aufnahme exogen applizierter DNA (Kap. 4.2.1.) und durch DNA-Austausch zwischen markierten und nicht markierten Zellen (Kap. 4.2.2.) untersucht.

##### 4.2.1. Aufnahme und Integration exogen applizierter DNA

Nach Inkubation nichtradioaktiv markierter Zellen in Wachstumsmedium mit radioaktiv markierter DNA, war die zelluläre DNA radioaktiv markiert, und alle Zellen relativ gleichmäßig markiert (Fig. 3.6., 3.7.). Der beobachtete Sättigungseffekt bei zunehmender DNA-Konzentration (Fig. 3.6.) wurde auch bei andern Studien bei Mausfibroblasten (Laval et al. 1970) und bei humanen Lymphocyten (Ohlbaum et al. 1977) beobachtet.

Diese Ergebnisse erlauben aber noch keine vollständige Aussage über

die Existenz des DNA-transfers unter normalen Kulturbedingungen, da hochmolekulare DNA durch Serumnukleasen hydrolysiert werden kann (Cox und Gokcen 1976, Loyter et al. 1982A). Deshalb kann der Anteil der in hochmolekularer Form eingebauten DNA, nicht exakt bestimmt werden. Es ist auch beschrieben, daß im Serum DNA-bindende Proteine die DNA vor der Hydrolyse durch DNase I schützen (Cox und Gokcen 1976).

Die einzelnen Serumnukleasen und die entstandenen Hydrolyseprodukte sind nicht charakterisiert, aber eine Markierung der DNA durch hydrolysiertes Thymidin, wie bei der Markierung mit H-3dThd, ist auszuschließen, da im Serum keine Phosphatasen nachgewiesen sind. Die bekannten Endo- und Exonukleasen produzieren Mono- und Oligonukleotide (Kornberg 1980), welche im Vergleich zu den Nukleosiden die Plasmamembran wesentlich schlechter passieren können (Cleaver 1967). Diese Mono- oder Oligonukleotide können wie die hochmolekulare DNA über lokale Poren oder durch Phagozytose in das Zellinnere gelangen (Loyter et al. 1982B), und weiter zum Zellkern transportiert werden, wo sie in die zelluläre DNA inkorporiert werden können.

Eine Abschätzung des prozentualen Anteils der DNA, die in hochmolekularer Form eingebaut wird, ist auf Grund des gewählten experimentellen Designs nicht möglich, und sollte durch zusätzliche Experimente untersucht werden.

#### 4.2.2. DNA-Austausch zwischen Zellen

Wenn trypsinierte, radioaktiv markierte und nichtmarkierte Zellen gemischt wurden, so konnten nach 24 h Inkubation leicht und stark markierte Zellen autoradiographisch unterschieden werden (Fig. 3.8.). Die Markierung der schwachmarkierten Zellen kann über zwei Wege erfolgen:

- (i) durch die von den lysierten Zellen freigesetzte DNA, die im Wachstumsmedium vorhanden ist,
- (ii) durch DNA-Austausch zwischen benachbarten Zellen.

Welcher Markierungsweg für die Markierung der schwach markierten Zellen verantwortlich ist, ist nicht bekannt.

Durch eine Trennung der nach dem Trypsinieren ungeschädigten Zellen, von der durch lysierte Zellen freigesetzte DNA, kann der Umfang des DNA-Austauschs bei BHK 21 Zellen weiter analysiert werden.

Eine DNA-Exkretion ins Wachstumsmedium, wie sie bei unstimulierten Lymphozyten beschrieben ist (Anker et al. 1980) ist bei BHK 21 Zellen auszuschließen, da bei konfluenten Zellen, die während des Wachstums radioaktiv markiert wurden, nach dem Mediumwechsel keine Radioaktivität im Wachstumsmedium beobachtet werden konnte.

#### 4.3. Konsequenzen

Die Beobachtung, daß beim Trypsinieren von Monolayer Zellen ein hoher Anteil der Zellen lysiert wird (Kap. 4.1.) und daß DNA aus dem Medium aufgenommen und in die zelluläre DNA integriert wird (Kap. 4.2.) hat weitreichende Konsequenzen:

- (i) bei Arbeiten, bei denen die genaue Anzahl der Zellverdoppelungen von Bedeutung ist,
- (ii) bei Arbeiten, bei denen die Homogenität einer Zelllinie über einen längeren Zeitraum vorausgesetzt wird.

(i) Es wird allgemein angenommen, daß bei einer Verdünnung im Verhältnis 1:2 alle Zellen eine Zellteilung bis zum Erreichen der Konfluenz durchlaufen (Vincent und Huang 1976, Holliday et al. 1981). Wenn jedoch 30 - 50 % der Zellen durch das Ablösen irreversibel geschädigt werden, so durchlaufen die verbleibenden Zellen 3 - 4 Zellzyklen bis zum Erreichen des konfluenten Stadiums. Dies hat Konsequenzen für die 'Commitment theory of aging', da dann die Teilungsrate sowohl für die 'committed - ' als auch für die 'un-committed cells' höher ist.

(ii) Über einen längeren Zeitraum kann die Homogenität einer Zelllinie verändert werden. Die von den lysierten Zellen freigesetzte DNA kann von den ungeschädigten Zellen aufgenommen und stabil in das Genom integriert werden (Kap. 1.3.). Es ist möglich, daß der Prozess der DNA-Aufnahme durch die Permeabilisierung der Zellen erleichtert wird.

#### 4.4. Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA

##### 4.4.1. Nuklidgehalt im Blutplasma der Mäuse

Der Nuklidgehalt im Gewebewasser ist gleich dem Nuklidgehalt im Blutplasma (Pietrzak-Flis et al. 1978). Bei HTO Exposition war der Nuklidgehalt im Gewebewasser etwa 60 % des Nuklidgehalts im Trinkwasser. Das Verhältnis Nuklidgehalt im Gewebewasser zu Trinkwasser variiert bei Swiss Albino Mäusen zwischen 0.67 (Commerford et al. 1982A) und 0.76 (Commerford et al. 1978), und bei Hale Stoner Brookhaven Mäusen, bei denen 17 Tage nach Expositionsbeginn ein steady state erreicht wird, ist das Verhältnis 0.57 (Ikushima et al. 1984).

##### 4.4.2. Kinetik des Einbaus

Bei Zellkulturen: Die Kinetik des Einbaus von H-3 von H-3glucose in die DNA zeigte bei Zellkulturen ca 50 h nach dem Einpflanzen ein Plateau. Diese Ergebnisse zeigen, daß Zellkulturen, die während des exponentiellen Wachstums markiert werden, ein geeignetes Untersuchungssystem darstellen.

Bei Mäusen: Der Nuklidgehalt im Gewebewasser der Mäuse erreichte nach etwa 10 Tagen ein Plateau und mit Ausnahme der DNA aus Muskelgewebe erreichte die spezifische Aktivität der DNA nach 10 Tagen ein steady state (Fig. 3.10.) (Zipfel und Kasche 1982).

Die schnelle Markierung der DNA in den nichtproliferierenden Geweben bei erwachsenen Mäusen kann durch einen DNA-turnover (Kap. 4.5.) erklärt werden.

Der Zeitfaktor bis zum Erreichen des Gleichgewichts der spezifischen Aktivität der DNA ist bei den verschiedenen Geweben der Maus wesentlich höher als bei den Zellkulturen. Auf Grund des geringeren zeitlichen Aufwands sollten Zellkulturen auch zur Untersuchung der spezifischen Aktivität der DNA ein geeigneteres Untersuchungssystem darstellen.

#### 4.4.3. Spezifische Aktivität der DNA bei Markierung mit verschiedenen Vorstufen

Nach Gleichgewichtseinstellung und unter Berücksichtigung der Verdünnung der Vorstufen in den verschiedenen Pools, kann bei Zellkulturen die spezifische Aktivität der DNA aus der spezifischen Aktivität der einzelnen Vorstufen berechnet werden (Tab. 3.6.). Bei Aspartat kann der Verdünnungspool mit anderen Proteinen oder Aminosäuren des Mediums (Serum) nicht exakt berechnet werden. Dies führt zu Fehlern bei der Berechnung der spezifischen Aktivität der DNA.

Bei den verschiedenen Geweben der Maus kann die spezifische Aktivität der DNA unter den gleichen Bedingungen nicht exakt berechnet werden, da gewebespezifische Unterschiede auftreten. Die beobachteten Unterschiede in der spezifischen Aktivität der DNA der einzelnen Gewebe können erklärt werden, durch:

- Stoffwechselunterschiede in den einzelnen Geweben, die zu einem unterschiedlichen Metabolismus der aufgenommenen Nahrung führen,
- durch unterschiedliche Verdünnung der markierten Vorstufen mit Lipiden und Proteinen in den einzelnen Geweben, die nicht exakt berechnet werden können,
- gewebespezifische Unterschiede zwischen oxidativem und nichtoxidativem Pentose-Phosphat-Zyklus; die zu einer unterschiedlichen Markierung der Stoffwechselzwischenprodukte führen.

Gewebespezifische Unterschiede während und nach HTO Markierung wurden im organischen Kompartiment beobachtet, bei Mäusen (Commerford et al. 1977, 1982A, B, Hatch und Mazrimas 1972), bei Ratten (Pietrzak-Flis et al. 1982), bei Kaninchen (Pietrzak-Flis et al. 1978) und bei Schweinen (Van Bruwaene et al. 1982).

Im Gegensatz zu den Zellen, die während des exponentiellen Wachstums markiert wurden, wurden die Mäuse als erwachsene Tiere exponiert. Trotzdem stimmt bei der HTO Markierung die spezifische Aktivität der Pankreas-DNA und bei Markierung mit C-14glucose die spezifische Aktivität der Muskel-DNA mit der theoretisch berechneten spezifischen Aktivität überein, so daß angenommen werden kann, daß die gesamte DNA markiert ist.

Bei Swiss Albino Mäusen, deren Eltern mit HTO (111 KBq/ml) exponiert wurden, und die nach ihrer Geburt für acht Monate exponiert wurden, war die spezifische Aktivität der DNA von Gehirn- und Leberzellen mit  $4.81 \cdot 10^6$ , bzw.  $5.4 \cdot 10^6$  Bq/mol Nukleotid (Commerford et al. 1982B) in der gleichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit ermittelte spezifische Aktivität der Pancreas-DNA.

Diese Befunde sollen jedoch durch eine direkte Markierung der DNA von Mäusen vor der Geburt und während des Wachstums abgesichert werden, da Unterschiede in der spezifischen Aktivität des Nukleotidpools auftreten (Kap.4.5.5.), und die beobachteten Unterschiede in der spezifischen Aktivität der DNA bei den einzelnen Geweben auf diesen Sachverhalt zurückgeführt werden könnten.

#### 4.4.4. Aminosäuremetabolismus

Von Mäusen die mit HTO exponiert waren, wurde die spezifische Aktivität von einzelnen Aminosäuren der Serumproteine bestimmt (Commerford et al. 1983).

Das Konzept der spezifischen Aktivität sollte auch für die Markierung der einzelnen Aminosäuren gültig sein. Deshalb wurde die Anzahl der H-Atome, die mit H-3 von HTO während der Biosynthese markiert werden können bestimmt (White et al. 1973, Stryer 1981). Für die einzelnen, nicht essentiellen Aminosäuren sind die Anzahl der markierbaren H-Atome, und das Verhältnis zwischen gemessener spezifischer Aktivität der Aminosäuren und der spezifischen Aktivität des Trinkwasser in Tabelle 4.1. dargestellt. Die Anzahl der markierbaren H-Atome sollte mit dem ermittelten Verhältnis  $SA_{\text{Aminosäure}}/SA_{\text{HTO}}$  übereinstimmen.

Die Diskrepanz zwischen den experimentellen Werten und den theoretisch bestimmten Werten ist darauf zurückzuführen, daß

- nicht alle Aminosäuren 'de novo' synthetisiert werden, da dem Futter Aminosäuren zugesetzt sind, über deren Konzentration keine Angaben gemacht wurden,
- eine geringe Menge von Aminosäuren von der Darmflora synthetisiert werden, die über den Darm aufgenommen werden können.

| Aminosäure <sup>1)</sup> | Anzahl der H-Atome<br>die mit H-3 markiert<br>werden können | $\frac{SA_{\text{Aminosäure}}}{SA_{\text{Trinkwasser}}}$ <sup>2)</sup> |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Alanin                   | 2                                                           | 1.40                                                                   |
| Arginin                  | 1                                                           | 1.15                                                                   |
| Aspartat                 | 2                                                           | 0.64                                                                   |
| Cystein                  | 2                                                           | 0.55                                                                   |
| Glutamat                 | 1                                                           | 1.33                                                                   |
| Glycin                   | 1                                                           | 0.69                                                                   |
| Histidin                 | 1                                                           | 0.97                                                                   |
| Methionin                | 4                                                           | 3.74                                                                   |
| Prolin                   | 1                                                           | 0.87                                                                   |
| Serin                    | 2                                                           | 0.88                                                                   |

1) essentielle Aminosäuren sind nicht berücksichtigt

2) Die spezifische Aktivität des Trinkwassers war 111 KBq/ml (3µCi/ml)  
Der Aminosäuregehalt der Nahrung wurde nicht berücksichtigt.

Tab. 4.1. Spezifische Aktivität einzelner Aminosäuren der Serumproteine von Mäusen, die mit HTO exponiert waren  
(experimentelle Daten von Commerford et al. 1983)

#### 4.4.5. Untersuchung des Einbaus auf Nukleosid-Ebene

Die Trennung der enzymatisch verdauten DNA zeigt neben den Nukleosiden zusätzliche, nicht identifizierte Peaks. Diese Peaks sind vermutlich Nukleotide, die von einer unvollständigen Phosphatase-Verdauung herrühren, da bei der Analyse von H-3dThd markierter DNA, nur zusätzlich ein radioaktiv markierter Peak auftrat (Ergebnisse nicht dargestellt.).

Die enzymatische Verdauung der DNA und die Analyse der Nukleoside durch HPLC-Trennung bietet unter standardisierten Bedingungen die Möglichkeit zur schnellen Bestimmung der Basenzusammensetzung (Kuo et al. 1980) und zur quantitativen Bestimmung von chemisch modifizierten- (Bs. methylcytosin (Eick et al. 1983)) oder physikalisch modifizierten Nukleosiden (Bs. Thymidindimere (Cadet et al. 1983)).

Zusätzlich können die verschiedenen Stoffwechselwege, die bei den verschiedenen Geweben zu einer unterschiedlichen Markierung der DNA führen, durch die Analyse der spezifischen Aktivität der einzelnen Nukleoside aufgeklärt werden.

Ein Vergleich der beiden verwendeten Untersuchungssysteme (Zellkultur vs. tierische Gewebe) zeigt, daß Zellkulturen zur Untersuchung des Konzepts der spezifischen Aktivität das geeignetere Testsystem darstellen:

- (i) Zellkulturen eine homogene Zellpopulation darstellen, und keine unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten der einzelnen Zellen oder Zellwanderung auftreten können.
- (ii) die bei der Berechnung der spezifischen Aktivität der Vorstufen nicht exakt bekannte Größen, wie das Verhältnis oxidativer vs. nichtoxidativer Pentose Phosphat Zyklus konstant ist, und der Lipid- und Proteinmetabolismus kleiner als bei den einzelnen Geweben ist,
- (iii) der materielle und zeitliche aufwand bei Arbeiten mit Zellkulturen wesentlich geringer ist.

#### 4.4.6. Berechnung der Dosis über das Konzept der spezifischen Aktivität

Die Ergebnisse in Tab. 3.6. zeigen, daß das Konzept der spezifischen Aktivität auch zur Berechnung der Dosisfaktoren von H-3 und C-14 bei chronischer Exposition benutzt werden kann. Dies gilt auch, wenn die Nuklide in anorganischer Form dargeboten werden.

Das Verhältnis zwischen experimenteller spezifischer Aktivität der DNA und der berechneten spezifischen Aktivität zeigt Gewebedaunterschiede und ist bei einzelnen Geweben kleiner 1. Trotzdem sollte für konservative Dosisberechnungen ein Verhältnis von 1 zu Grunde gelegt werden.

Bei chronischer Belastung mit H-3 und C-14 kann das Konzept der spezifischen Aktivität für eine konservative Dosisberechnung benutzt werden. Damit können die einzelnen Dosisfaktoren einfacher berechnet werden als bei den bestehenden Strahlenschutzvorschriften, in denen die Berechnung der Dosisfaktoren auf Stoffwechsel-

daten beruht. Bei Verwendung des Konzepts der spezifischen Aktivität kann die Jahresdosis für ein Nuklid N aus Gleichung 4.1 berechnet werden, wobei ein möglicher Isotopeneffekt nicht berücksichtigt wird.

$$\frac{\text{Dosis}}{a} = SA \cdot Df_N \left[ \frac{SV}{a} \right] \quad (4.1)$$

wobei:

SA - Spezifische Aktivität

$Df_N$  - Dosisfaktor für das Nuklid N

$$\left[ \frac{\text{Bq}}{\text{mol} \cdot N} \right] \left[ \frac{SV \cdot \text{mol } N}{a \cdot \text{Bq}} \right]$$

Der Dosisfaktor kann nach Gleichung 4.2 berechnet werden:

$$Df_N = \frac{\text{mol N}}{\text{kg}} \cdot e_N^{\beta-} \cdot 1.6 \cdot 10^{-19} \cdot t \cdot RBE \left[ \frac{\text{Sv mol}}{\text{Bq a}} \right] \quad (4.2)$$

wobei:

- $Df_N$  - Dosisfaktor für das Nuklid N
- $\frac{\text{mol N}}{\text{kg}}$  - Menge des nicht radioaktiven Nukleotids pro kg Gewebe (kann aus den anatomischen Daten von ICRP Rep. 23 berechnet werden)
- $e_N^{\beta-}$  - durchschnittliche Zerfallsenergie vom Nuklid N in eV
- $1.6 \cdot 10^{-19}$  - Faktor zur Umwandlung von eV in J
- $t$  - Zeit
- RBE - Relative Biologische Wirksamkeit

Der Dosisfaktor für H-3 kann berechnet werden, wobei

$$\begin{aligned} \frac{\text{mol H}}{\text{kg Gewebe}} &= 100 \text{ (nach ICRP (1975))} \\ e_{H-3}^{\beta-} &= 5.8 \cdot 10^3 \text{ eV} \\ t &= 3.2 \cdot 10^7 \text{ sec} \cdot \text{a}^{-1}, \text{ und} \\ RBE &= 1.0 \end{aligned}$$

$$Df_{H-3} = 3.0 \cdot 10^{-6} \left[ \frac{\text{Sv} \cdot \text{mol}}{\text{Bq} \cdot \text{a}} \right]$$

und für C-14, wobei:

$$\frac{\text{mol C}}{\text{kg Gewebe}} = 19.1 \quad (\text{nach ICRP 1975})$$

$$e_{\text{C-14}}^{\beta-} = 49 \cdot 10^3 \text{ eV}$$

$$t = 3.7 \cdot 10^7 \text{ sec} \cdot \text{a}^{-1}, \text{ und}$$

$$\text{RBE} = 1.0$$

$$Df_{\text{C-14}} = 4.8 \cdot 10^{-6} \left[ \frac{\text{Sv} \cdot \text{mol}}{\text{Bq} \cdot \text{a}} \right]$$

Die in anderen Arbeiten mit dem Konzept der spezifischen Aktivität berechneten Dosisfaktoren (für H-3:  $2.6 \cdot 10^{-6} \left[ \frac{\text{Sv} \cdot \text{mol}}{\text{Bq} \cdot \text{a}} \right]$  und für C-14:  $3.0 \cdot 10^{-5} \left[ \frac{\text{Sv} \cdot \text{mol}}{\text{Bq} \cdot \text{a}} \right]$ ) sind in der gleichen Größenordnung (Bonka 1980) wie die hier berechneten Werte.

#### 4.5. Bestimmung des DNA-turnovers in verschiedenen Systemen

DNA-turnover ist die kontinuierliche, zellzyklusunabhängige Erneuerung von Teilen der zellulären DNA. Im Gegensatz zur replikativen DNA-Synthese während der S-Phase, in der sich der DNA-Gehalt einer Zelle verdoppelt, erfolgt beim DNA-turnover keine, bzw. nur eine sehr geringe Zunahme des DNA-Gehalts einer Zelle. DNA-turnover sollte an einem stationären zellulären System untersucht werden, in dem keine replikative DNA-Synthese stattfindet und alle Zellen in  $G_1$ - bzw.  $G_0$ - Phase sind.

##### 4.5.1. Bei verschiedenen Geweben der Maus

Die Kinetik des Einbaus von zwei markierten Substanzen in die DNA sowie der Ausbau wurde in drei verschiedenen Geweben der Maus untersucht (Tab. 3.6.). Die untersuchten Gewebe Pankreas, Milz und Muskel haben eine unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit. In der Milz ist der Zellumsatz z. B. durch die Produktion von Lymphozyten sehr hoch, während der Zellumsatz vor allem im Pankreas und im Muskel sehr gering ist. Beide, Pankreas und Muskel, sind langsam proliferierende Gewebe, während Milz zu den schnell proliferierenden gehört (Cameron 1971).

Sowohl ein schneller Einbau der Nuklide in die DNA (die spezifische Aktivität erreicht in allen Geweben ein Plateau nach ca. 10 Tagen) und ein schneller Ausbau aus der DNA nach Absetzen der Nuklide kann in allen Geweben beobachtet werden. Nach dem Absetzen der Nuklide ist ein zweiphasiger Verlauf des Ausbaus zu beobachten, wobei die erste Phase in allen drei Geweben gleich ist, und deshalb unabhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit ist. Die zweite Phase ist in den einzelnen Geweben unterschiedlich und somit von der Proliferationsgeschwindigkeit abhängig. Die Daten über die relative Poolgröße in Tab. 3.8. zeigen, daß ca. 40 - 60 % der DNA bei allen Geweben mit einer Halbwertszeit von ca. 10 Tagen umgesetzt wird.

Nach Absetzen der radioaktiven Vorstufe wurden vergleichbare Ergebnisse (eine zweiphasige Kinetik mit ähnlichen Poolgrößen und Halbwertszeiten) bei den nicht teilenden Gehirnzellen der Maus (Kimberlin 1974) und bei verschiedenen Geweben der Maus mit Ausnahme der Muskel-DNA (Gerber et al. 1960, Gerber und Maes 1981) beobachtet. Für die DNA aus Muskelzellen ist eine metabolische DNA beschrieben, die 40 % der gesamten zellulären DNA repräsentiert (Stroun et al. 1967). Die einzelnen Ergebnisse sind in Tab. 4.2. zusammengefaßt. Für die Stabilität der DNA aus Gehirnzellen liegen widersprüchliche Ergebnisse vor; es wurde auch eine Halbwertszeit von 593 Tagen für die aus dem Gehirn erwachsener Mäuse isolierten DNA ermittelt (Commerford et al. 1983). Diese Experimente erlauben allerdings keine Charakterisierung des schnellen Kompartiments, da die ersten Proben am 13. und 27. Tag nach dem Absetzen der radioaktiven Quelle untersucht wurden.

Diese beobachtete Instabilität kann nicht auf eine durch die Desintegration dieser Nukleotide in der DNA induzierte DNA-Reparatur zurückgeführt werden. Von den Werten der spezifischen Aktivität und einem DNA-Gehalt von 6 pg pro Zelle kann berechnet werden, daß während der Plateauphase innerhalb von 10 Tagen ca. 0.1 (HTO), 0.05 (H-3-glucose) und 0.01 (C-14-glucose) Zerfälle pro Zelle auftreten. Unter Berücksichtigung des Nuklidgehalts der wässrigen Komponente (ca. 50 %) und Größe des Nucleus einer Pankreaszelle kann die Dosis für den Zellkern berechnet werden (Bond und Feinendegen 1966). Die Kerndosis für H-3 bei HTO-Markierung ist etwa ein Faktor 100, bei H-3-glucose-Markierung ein Faktor 10 der Dosis von C-14-glucose. Eine Abhängigkeit der relativen Poolgröße und der Halbwertszeit von der Kerndosis kann nicht beobachtet werden (vgl. Tab. 3.8.).

Eine autoradiographische Auswertung der einzelnen Gewebe wurde nicht durchgeführt, da bei den zur Markierung verwendeten Substanzen alle zellulären Moleküle radioaktiv markiert werden. Deshalb war eine Kontrolle, ob Zellwanderung oder ein besonders schnell proliferierendes Zellkompartiment innerhalb eines Gewebes für den beobachteten Turnover verantwortlich ist, nicht möglich. Eine Erklärung des beobachteten Turnovers durch schnellen Turnover der mitochondrialen DNA ist auf Grund des geringen Anteils

| Gewebe   | DNA-Pool mit<br>schnellem Turnover |                     | DNA-Pool mit<br>langsamem Turnover |                     | Bemerkung | Referenz             |
|----------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|-----------|----------------------|
|          | T <sub>1/2</sub>                   | rel. Pool-<br>größe | T <sub>1/2</sub>                   | rel. Pool-<br>größe |           |                      |
| Pankreas | 5.2                                | 0.79                | 416                                | 0.21                | Maus      | Tab. 3.7.            |
| Milz     | 11.5                               | 0.65                | 117                                | 0.35                | Maus      | Tab. 3.7.            |
|          | 4.0                                | 0.40                | 45                                 | 0.60                | Ratte     | Gerber et al. 1960   |
|          | 3.4                                | 0.79                | -                                  | 0.21                | Maus      | Gerber und Maes 1981 |
| Muskel   | 5.0                                | 0.75                | 222                                | 0.25                | Maus      | Tab. 3.7.            |
|          | 26.0                               |                     | -                                  | -                   | Ratte     | Gerber et al. 1960   |
|          |                                    | 0.40                | -                                  | -                   | Maus      | Stroun et al. 1967   |
| Gehirn   | 10.0                               | 0.70                | 110                                | 0.30                | Maus      | Kimberlin 1974       |
|          | 15.0                               | 0.64                | -                                  | 0.36                | Maus      | Gerber und Maes 1981 |
| Leber    | 9.8                                | 0.65                | -                                  | 0.35                | Maus      | Gerber und Maes 1981 |

Tab. 4.2. Halbwertszeit und relative Poolgröße bei verschiedenen Geweben der Maus und Ratte, wenn die spezifische Aktivität der DNA nach dem Absetzen der radioaktiven Vorstufe bestimmt wird.

der mitochondrialen- an Kern-DNA (5%) auszuschließen.

Autoradiographische Untersuchungen zeigen in den nichtteilenden Geweben (Muskel, Gehirn) nach langer Expositionszeit ( $> 250$  Tage) leicht markierte Zellen (ca. 2 % der Markierung der stark markierten Zellen) (Pelc 1962). Nach Thymidinemarkierung konnte in Purkinje Neuronen eine S-Phasen unabhängige Markierung der Zellkerne beobachtet werden (Cameron et al. 1979), und es wurde gezeigt, daß der beobachtete DNA-turnover nicht auf den schnellen Turnover einer Zellfraktion zurückzuführen ist (Kimberlin et al. 1974).

Die Existenz des DNA-turnovers ist umstritten (Cleaver 1967). Die Markierung von Zellen in nicht teilenden Geweben wird durch Zellmigration und die widersprüchlichen Ergebnisse der Autoradiographie als Artefakte erklärt (Commerford et al. 1982). Bei der autoradiographischen Analyse des DNA-turnovers scheint jedoch die Expositionszeit eine kritische Größe zu sein. Schwach markierte Zellen werden nur nach langen Expositionszeiten ( $> 100$  Tage) erkannt (Pelc und Viola-Magni 1969), während in vielen Arbeiten, in denen kein DNA-turnover beobachtet wird, die Autoradiogramme nur kurz ( $< 30$  Tage) exponiert waren und damit eine Unterscheidung der schwach markierten Zellen vom Background nicht möglich wird (Watts und Harris 1959, Farber et al. 1971).

Die Existenz des DNA-turnovers kann in nichtproliferierenden Geweben von erwachsenen Mäusen nicht eindeutig nachgewiesen werden, da Gewebe keine homogene Zellpopulation darstellen und auch in nichtproliferierenden Geweben sich eine Zellfraktion teilen, bzw. Zellmigration stattfinden kann. Aus diesen Gründen wurde die Existenz des DNA-turnovers an einem geeigneteren, homogenen Zellsystem, an Monolayer Zellkulturen, weiter untersucht.

#### 4.5.2. Bei konfluenten Monolayer Zellen

Neben dem geringen materiellen und zeitlichen Aufwand, können bei Zellkulturen Untersuchungen an einer homogenen Zellpopulation durchgeführt werden. Zusätzlich ist bei einer charakteristischen Populationsdichte das Zellwachstum gestoppt oder stark reduziert, und die Zellen sind in  $G_1$ - bzw.  $G_0$ -Phase. Somit stellen sie ein geeignetes stationäres System zur Untersuchung des DNA-turnovers dar.

#### 4.5.2.1. Analyse der spezifischen Aktivität

Durch Analyse der spezifischen Aktivität der DNA nach Einbau von H-3dThd in die DNA, bzw. nach Ausbau von H-3 aus der DNA wurde DNA-turnover bei Zellkulturen untersucht.

Bei verschiedenen stationären, ruhenden Zellen (BHK 21, CHO und MRC-5) wurde ein Ein- und Ausbau von H-3dThd in die DNA beobachtet, wenn die spezifische Aktivität der DNA zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe von Wachstumsmedium mit H-3dThd, bzw. nach Entfernen des radioaktiven Mediums gemessen wurde (vgl. Fig. 3.14. - 3.25.) (Zipfel et al. 1981, 1982B).

Die Markierung der DNA, bzw. der Ausbau der Markierung aus der DNA, kann aus folgenden Gründen nicht alleine auf eine Stimulierung der DNA-Synthese durch den Mediumwechsel zurückgeführt werden:

- (i) Es findet auch ohne Mediumwechsel ein Einbau bei 8 Tage alten Kulturen statt (Fig. 3.24).
- (ii) Die für die Stimulierung typische lag-Phase von 12 - 18 h wird nicht beobachtet, und es kann ein deutlicher Einbau, bzw. Ausbau innerhalb der ersten 6 - 8 h nachgewiesen werden.
- (ii) Ein Serumeffekt tritt nicht auf. Bei geringer Serumkonzentration von 0.5 - 1 % findet keine Stimulierung der DNA-Synthese statt, und die dargestellten Ergebnisse zeigen bei allen Zellarten teilweise eine stärkere Markierung bei geringer Serumkonzentration.

#### 4.5.2.2. CsCl-Gradientenzentrifugation

Eine Analyse der mit H-3BrdU pulsmarkierten DNA von stationären, ruhenden Zellen im CsCl-Gradienten unter alkalischen Bedingungen führte zu einer Trennung der neusynthetisierten H-3 markierten DNA von der parentalen DNA (Fig. 3.32., 3.33.).

Die Überschneidung der beiden Peaks im Bereich mittlerer Dichte kann durch die Verwendung hochmolekularer DNA erklärt werden, da replizierende DNA als intaktes Molekül im Bereich mittlerer Dichte sedimentiert. Der Einsatz hochmolekularer DNA war notwendig, um

eine Markierung der parentalen DNA nachzuweisen. Bei geringen Molekulargewichten würden die durch DNA-turnover markierten Fragmente von der parentalen DNA getrennt werden. In anderen Studien, bei denen eine bessere Strangtrennung erfolgte, wurde DNA mit geringen Molekulargewichten eingesetzt (Bernheim u. Mendelsohn 1978). Eine Markierung der parentalen DNA konnte somit auf Grund des experimentellen Designs nicht eindeutig nachgewiesen werden. Durch Hydroxyharnstoff konnte die replikative DNA-Synthese jedoch soweit gehemmt werden, daß eine deutliche Markierung der parentalen DNA beobachtet wurde (Fig. 3.33.D).

Mit der CsCl-Gradientenzentrifugation konnte bei E.coli DNA-turnover nachgewiesen werden (Grivell et al. 1975), bei tierischen Zellen jedoch nicht (Gautschi et al. 1972, Smith und Hanawalt 1976B). Der Ausgangspunkt für die Untersuchung des DNA-turnovers im CsCl-Gradienten war der Einbau von H-3dThd in die DNA unbestrahlter Zellen während DNA-Reparaturstudien. Nachdem gezeigt wurde, daß bei HeLa- und CHO-Zellen die spezifische Aktivität der parentalen DNA nach mehrmaligem Rebanding unter alkalischen Bedingungen abnimmt, wurde DNA-turnover in unbestrahlten Zellen als Artefakt bezeichnet (Gautschi et al. 1972). Allerdings wurde dabei kein konfluentes Zellsystem verwendet. Selbst bei stationären, ruhenden Zellen findet replikative DNA-Synthese statt und es kommt zur Überlappung der beiden DNA-Banden im CsCl-Gradienten, was den Nachweis der Markierung der parentalen DNA erschwert. Bei exponentiell wachsenden Zellen ist der Anteil - und damit die Markierung der neusynthetisierten DNA - wesentlich stärker, weshalb eine Markierung der parentalen DNA im CsCl-Gradienten nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Eine Markierung der DNA von unbestrahlten, fast konfluenten WI 38 Zellen wird beschrieben; nach CsCl-Gradientenzentrifugation konnte aber kein diskreter Peak im Bereich der parentalen DNA nachgewiesen werden. Diese erhöhte H-3 Aktivität im Bereich der mit P-32 vormarkierten parentalen DNA wurde deshalb mit einer Überschneidung von P-32 im H-3 Kanal während der Flüssigscintillation erklärt (Smith und Hanawalt 1976B). Eine Analyse der Arbeiten, die eine Markierung der DNA von unbestrahlten Zellen mittels CsCl-Gradientenzentrifugation untersuchen, zeigte, daß auf Grund des jeweiligen experimentellen Designs die Beobachtung einer Markierung der

parentalen DNA gar nicht möglich war. In 75 % der Arbeiten wurden exponentiell wachsende Zellen verwendet, bei denen, auf Grund der starken Markierung der neusynthetisierten DNA, die Markierung der parentalen DNA nur im Backgroundbereich liegen konnte.

In 67 % aller Arbeiten wurde H-3dThd und BrdU an Stelle von H-3BrdU zur Markierung der DNA verwendet. Diese 'kostengünstigere' Markierung führt zu Artefakten, da beim Einbau beider Vorstufen die beteiligten Enzyme eine höhere Spezifität gegenüber BrdU zeigen (Hackett und Hanawalt 1966, Smith und Hamawalt 1976B). Somit wird bei geringer Einbaurate hauptsächlich BrdU in die DNA eingebaut, so daß keine Markierung der DNA mit H-3 beobachtet werden kann. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen System konnte nach Inkubation der Zellen mit H-3dThd und BrdU kein Einbau von H-3dThd in die DNA nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die gleichen Ergebnisse wie in Fig. 3.30.D, eine deutliche Markierung der parentalen DNA, die nicht auf Peaküberschneidung zurückzuführen ist, wurde bei Epidermiszellen der Maus beobachtet, wenn die replikative DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff gehemmt wurde (Bowden et al. 1975).

#### 4.5.2.3. Autoradiographie

Die Ergebnisse der Autoradiographie zeigen bei stationären, ruhenden BHK 21 Zellen nach Mediumwechsel und 8 h Inkubation mit H-3BrdU (Fig. 3.30.) einen Anteil stark markierter Zellen (25 %), während alle restlichen Zellen leicht markiert sind. Es wird angenommen, daß die hochmarkierten Zellen die sind, die sich während der Inkubation mit H-3BrdU in der S-Phase befanden, während die leicht markierten Zellen in G<sub>1</sub>-Phase waren und durch DNA-turnover markiert wurden. Durch Hydroxyharnstoff wird sowohl der Anteil an stark markierten Zellen, als auch der Einbau in die leicht markierten Zellen gehemmt (Fig. 3.32.D).

Bei Inkubation der Zellen mit H-3BrdU ohne Mediumwechsel (Fig 3.33.C) ist der Anteil der stark markierten Zellen und der Einbau in die leicht markierten Zellen reduziert. Aber auch hier sind Zellen markiert.

Der Mediumwechsel übt beides, einen Einfluß auf den Anteil der stark markierten Zellen und auf die Höhe der Markierung der leicht markierten Zellen aus. Vermutlich ist bei beiden Prozessen der Nährstoffgehalt des Mediums von Bedeutung.

Die markierten Zellen können nur nach langer Expositionszeit ( > 4 Wochen ) vom Background unterschieden werden. Bei dieser Expositionszeit ist die Silberkornschwärzung bei den stark markierten Zellen im Sättigungsbereich und sie können deshalb nicht genau analysiert werden. Allerdings wurden bei der mikroskopischen Auswertung qualitative Unterschiede in der Markierung beobachtet, die dadurch erklärt werden können, daß einige Zellen nur während eines Teils der S-Phase mit H-3BrdU markiert wurden.

Die in der Literatur verwendeten Expositionszeiten von 7 Tagen (Watts und Harris 1959, Farber et al. 1971) sind so gewählt, daß die stark markierten Zellen gut ausgezählt werden können. Unter diesen Bedingungen können die leicht markierten Zellen aber nicht mehr vom Background unterschieden werden.

Die Bedeutung langer Expositionszeiten erklärt teilweise die widersprüchlichen Ergebnisse über die Existenz des DNA-turnovers, da bei kurzen Expositionszeiten keine Markierung aller Zellen beobachtet wird (Watts und Warris 1959) und bei tierischen Geweben eine Markierung aller Zellen nur bei sehr langen Expositionszeiten ( > 250 Tage) beobachtet wird (Pelc 1962).

Ein direkter Einfluß der Expositionszeit auf den Anteil der markierten Zellen ist beschrieben: Nach 14 tägiger Expositionszeit sind in der adrenalen medulla der Ratte 5 % der Zellen leicht markiert, während nach 150 tägiger Exposition 9.8 % leicht markiert sind und vom Background unterschieden werden können (Pelc und Viola Magni 1969).

Im Vergleich zu anderen Zellsystemen, wo 8 Tage nach dem Einimpfen 0.5 % bei WI-38 Zellen (Farber et al. 1971), 1 % bei Swiss 3T3 Zellen (Rozengurt und Sinnott-Smith 1983) und 1 - 3 % bei CHO Zellen (Hahn und Little 1972) stark markiert sind, ist ein gemessener Anteil stark markierter Zellen von 12 % ohne und 25 % mit Mediumwechsel sehr hoch. Die Zellen eines konfluenten Zellsystems können in zwei Kategorien aufgeteilt werden: In Zellen, die replikative DNA-Synthese durchführen, und in Zellen, die in einen stationären Zustand übergegangen sind und deren Stoffwechselaktivi-

tät geringer ist. Durch Trypsinbehandlung wird ein großer Teil der Zellen geschädigt (Kap. 3.5.) und es ist anzunehmen, daß die stationären Zellen stärker geschädigt werden. Diese Überlegung erklärt zum Teil den hohen Anteil an stark markierten Zellen. Sie wird durch die Beobachtung unterstützt, daß der Anteil an stark markierten Zellen nicht linear mit der Inkubationszeit zunimmt. In den Ansätzen mit Mediumwechsel (Fig. 3.32.) sind nach 4 h 10 % und nach 8 h 25 % der Zellen stark markiert. In den Ansätzen ohne Mediumwechsel (Fig. 3.33.) beträgt der Anteil stark markierter Zellen nach 4 h Inkubation 11 % und nach 8 h 12 %. Aus diesem Grunde sollten die Zellen direkt auf einem Objektträger inkubiert werden und ohne enzymatische Behandlung zur Autoradiographie verwendet werden.

#### 4.5.3. Einfluß des Mediumwechsels

Bei verschiedenen Zellsystemen ist eine Stimulierung der DNA-Synthese durch Mediumwechsel oder durch andere Stimuli beschrieben. Der Beginn der DNA-Synthese und der Anteil an stimulierten Zellen nach Stimulierung von konfluenten, nicht transformierten Zellen ist in Tab. 4.3. dargestellt. Bei allen Zellsystemen beginnt die DNA-Synthese frühestens 12 h nach dem Mediumwechsel und der Anteil der stimulierten Zellen hängt unter anderem von der Art des Stimulus ab. Bei geringer Serumkonzentration (2 %) ist der Anteil der stimulierten Zellen gering (0.5 %) (Todaro et al. 1965).

Bei der Stimulierung der DNA-Synthese beginnt der deutliche Einbau von H-3dThd in die DNA erst nach einer lag-Phase von 12 - 15 h. Die maximale DNA-Synthese Aktivität ist nach 18 - 24 h zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigen die in dieser Arbeit eingesetzten Zellen eine deutliche Markierung der DNA während der ersten 6 - 12 h. Diese Unterschiede können zum Teil durch die Analyse-Methoden erklärt werden. Bei autoradiographischer Auswertung wird selten ein Einbau während der lag-Phase beobachtet, während bei der Untersuchung der spezifischen Aktivität der isolierten DNA eine stärkere Markierung der DNA der unstimulierten Proben und teilweise ein kontinuierlicher Einbau während der lag-Phase auftritt

| Zellen                 | Stimulus         | Beginn der DNA-Synthese nach Stimulierung [h] | stimulierte Zellen [%] | Referenz                    |
|------------------------|------------------|-----------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 12                                            | 27                     | Wiebel und Baserga 1969     |
| WI-38                  | Med. + 30 % f.S. | 14                                            | 40                     | Farber et al. 1971          |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 14                                            |                        | Augenlicht und Baserga 1974 |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | -                                             | 17                     | Rossini et al. 1975         |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 20                                            |                        | Bartholomew et al. 1976     |
| WI-38                  | Med. + 10 % f.S. | 18                                            |                        | Bombik und Baserga 1976     |
| 3T3                    | Med. + 10 % f.S. | 14                                            | 6                      | Todaro et al. 1965          |
| 3T3                    | Med. + 2 % f.S.  | 14                                            | 0.5                    | "-                          |
| 3T3                    | Med. + 40 % f.S. | 18                                            | 1.5                    | Yeh und Fischer 1969        |
| Fibroblasten (Huhn)    | Med. + 16 % f.S. | 12                                            | 25                     | Temin 1971                  |
| Glioma ähnliche Zellen | Med. + 40 % f.S. | 16                                            |                        | Lindgren et al. 1975        |
| Milz Zellen            | LPS              | 11                                            |                        | Kelly et al. 1983           |
|                        | Con A            | 15                                            |                        | "-                          |

Tab. 4.3. Beginn der DNA-Synthese und Anteil der stimulierten Zellen nach Stimulierung von konfluenten, nicht transformierten Säugerzellen mit verschiedenen Stimuli (f.S. - fötales Kälberserum, LPS - Lipopolysaccharide, und Con A - Conavalin A).

(Tab. 4.4). Der Grund für diesen Unterschied liegt im experimentellen Design, da entweder Pulsmarkierung von kurzer Dauer oder bei den Autoradiographien kurze Expositionszeiten gewählt wurden. Obwohl bei den untersuchten Zellen eine deutliche Markierung der DNA innerhalb der ersten 6 - 12 h nach dem Mediumwechsel stattfand und der Einbau bei geringer Serumkonzentration nicht reduziert war, zeigte der tägliche Mediumwechsel einen deutlichen Effekt auf die Höhe der spezifischen Aktivität. Auch bei täglichem Mediumwechsel war der Einbau bei geringer Serumkonzentration höher.

Verglichen mit der spezifischen Aktivität nach einmaligem Mediumwechsel war der Einbau nach 4 Tagen bei 20 % Serum und täglichem Mediumwechsel doppelt so hoch, bei 4 % Serum viermal so hoch (Fig. 3.22. und Fig. 3.14.).

Bei beiden Serumkonzentrationen war nach 6 Tagen ein Maximum zu beobachten. Der kontinuierliche Anstieg nach 24 h kann irreführend sein, da nur eine Probe pro Tag gemessen wurde und eventuell auftretende Maxima deshalb nicht registriert wurden. Der Ausbau bei täglichem Mediumwechsel zeigte allerdings keinen Unterschied bei beiden Serumkonzentrationen (vgl. Fig. 3.23.). 12 h nach dem ersten Mediumwechsel erreichte die spezifische Aktivität der DNA ein Minimum, und war nach 24 h höher als der Ausgangswert.

Wenn kein Mediumwechsel zu Versuchsbeginn erfolgte, d.h. wenn H-3dThd zu acht Tage altem Medium gegeben wurde, konnte auch ein Einbau in die DNA beobachtet werden. Nach 24 h ist der Einbau, verglichen mit dem Einbau nach Mediumwechsel (Fig. 3.22.), um 65 % reduziert (die Werte wurden korrigiert, da sich die H-3dThd-Konzentration in beiden Ansätzen unterscheiden).

#### 4.5.4. Hemmstoffe

Zur Charakterisierung der am beobachteten DNA-turnover beteiligten Enzyme wurden die Hemmstoffe Arabicytosin (araC), Dideoxythymidin (ddT), Hydroxyharnstoff (HU) und Novobiocin eingesetzt.

Arabinocytosin gilt als Hemmstoff der DNA-Polymerase  $\alpha$ . Es wird durch die DNA-Polymerase  $\alpha$  in die DNA eingebaut und wirkt durch eine Veränderung der Primer-Template Wechselwirkung als Strangterminator. Dideoxythymidin gilt als Inhibitor der DNA-Polymerase  $\beta$ ,

| Cells              | Stimulus         | Labeling conditions | Method               | Experimental Design | Remarks               | Incorp. in control (%) | Mitosis control | Reference                   |
|--------------------|------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------|-----------------------------|
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | continuous          | Autoradiography      | 7 d Exposition      | Kinetic<br>no Kinetic | -                      | 0.1 - 0.5       | Farber et al. 1971          |
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | continuous          | Autoradiography      | 21 d Exposition     |                       | 6.7                    | -               | Wiesel and Baserga 1969     |
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | 1 h pulse           | Autoradiography      | 21 d Exposition     |                       | -                      | 1.0             | Augenlicht and Baserga 1974 |
| 3T3                | Med. + 10 % f.s. | ?                   | Autoradiography      | ?                   | Kinetic               | 1.5                    | -               | Todaro et al. 1965          |
| Chicken-Fibroblast | Med. + 16 % f.s. | pulse? min          | Autoradiography      | ?                   | Kinetic               | -                      | 2.0             | Temin 1971                  |
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | 2 h pulse           | DNA-isolation        | Acid sol. fraction  | Kinetic               | 8.9                    | -               | Rovera and Baserga 1973     |
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | 30 min pulse        | DNA-isolation        | Acid sol. fraction  |                       | 6.6                    | -               | Heby et al. 1975            |
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | 20 min pulse        | DNA-isolation        | Acid sol. fraction  |                       | 2.4                    | -               | Bombik and Baserga 1976     |
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | 1 h pulse           | Autoradiography      | Cell sol. fraction  | cont. incorporation   | 1.1                    | 1.0             | Rossini et al. 1971         |
| 3T3                | Med. + 10 % f.s. | pulse 2min          | DNA-isolation        |                     | cont. incorporation   | 4.0                    | 6.2             | Yeh and Fischer 1970        |
| Gloma like cells   | Med. + 40 % f.s. | continuous          | Autoradiography      | ?                   | Kinetic               | 8.5                    | -               | Lindgren et al. 1970        |
| WI-38              | Med. + 10 % f.s. | 20 h pulse          | DNA-isolation        | ?                   |                       | 5.0                    | -               | Bartholomew et al. 1976     |
| 3T3                | PDGF             |                     | Flow Microfluorimetr |                     |                       | -                      | 0.2             | Kelly et al. 1983           |
| Spleen cells       | LPS              |                     |                      |                     |                       | 7.8                    | -               | Kelly et al.                |

Tab. 4.4. Analyse der Kontrollen von Experimenten, bei denen die DNA-Synthese von konfluenten Zellen stimuliert wurde.  
Nur bei Analyse der isolierten DNA kann eine kontinuierliche Markierung der DNA beobachtet werden.

die vermutlich an der DNA-Reparatur beteiligt ist.

Hydroxyharnstoff wird als ein Inhibitor der DNA-Replikation eingesetzt. HU hemmt das Enzym Ribonukleotid-Diphosphat-Reduktase und verhindert dadurch die Umwandlung von rNDP zu dNDP, so daß für die 'de novo' Synthese der DNA nicht genügend dNTP vorhanden sind. Da bei der Reparatursynthese die Nukleotide über den Salvage Pathway bereitgestellt werden, wird die DNA-Reparatur nicht durch HU gehemmt.

Novobiocin ist ein Inhibitor der DNA-Topoisomerasen, Typ II. Für die DNA-Replikation und auch für die DNA-Reparatur müssen die zu reparierenden DNA-Abschnitte durch Topoisomerasen für die Reparaturenzyme zugänglich gemacht werden. Zusätzlich wird auch eine Hemmung der DNA-Polymerase  $\alpha$  durch Novobiocin beschrieben (Clarkson und Mitchell 1983).

Alle eingesetzten Hemmstoffe zeigten eine Hemmung des H-3dThd Einbaus in die DNA (Tab. 3.9.) und deshalb kann angenommen werden, daß sowohl DNA-Replikation als auch DNA-Reparatur an dem beobachteten Einbau beteiligt sind. Diese Beobachtung kann nur qualitativ interpretiert werden, da die eingesetzten Hemmstoffe nicht spezifisch wirken (Morita et al. 1982), und auch eine Beteiligung der DNA-Polymerase  $\alpha$  bei der DNA-Reparatur nachgewiesen ist (Snyder und Regan 1982, Bermudez 1982).

DNA-Topoisomerasen scheinen an dem beobachteten DNA-turnover nur in geringerem Maße oder gar nicht beteiligt zu sein, da Novobiocin auch die DNA-Polymerase  $\alpha$  hemmen kann (Clarkson und Mitchell 1982). Aus diesem Grunde kann vermutet werden, daß die durch DNA-turnover markierten Stellen primär aktive DNA-Bereiche repräsentieren.

In Gegenwart von Hydroxyharnstoff wird der Einbau von H-3dThd bzw. H-3BrdU in die DNA von konfluenten, ungeschädigten Zellen nicht vollständig gehemmt (Fig. 3.28., 3.30., Smith und Hanawalt 1976, Collins et al. 1982). Ebenso wird die replikative DNA-Synthese durch HU gehemmt, aber nicht vollständig reduziert (Fig. 3.32.D). Zusätzlich verringert HU den Einbau in die schwach markierten Zellen (Fig. 3.32.D, 3.32.C), so daß eine Hemmung der am DNA-turnover beteiligten Prozesse durch HU postuliert werden kann, wie auch in der Literatur berichtet wird (Erixon und Ahnström 1979, Collins et al. 1982).

#### 4.5.5. Nukleotidpool

Ein Vergleich der spezifischen Aktivität der DNA, der während des exponentiellen Wachstums markierten Zellen, mit der während des konfluenten Stadiums markierten Zellen, führt zu einem hohen theoretischen Anteil der am DNA-turnover beteiligten DNA (Tab. 3.10). Dabei wird vorausgesetzt, daß die spezifische Aktivität des Nukleotidpools in beiden Fällen gleich ist. Allerdings existieren zwei verschiedene Stoffwechselwege bei der Nukleotidsynthese, der de novo Pathway und der Salvage Pathway (Kornberg 1980), deren Bedeutung während der verschiedenen Zellzyklusphasen variiert. Beide Stoffwechselwege sind in Fig. 4.2. skizziert.

Während des exponentiellen Wachstum findet eine de novo Synthese der DNA statt, und alle Nukleotide müssen neusynthetisiert werden, so daß das extrazellulär applizierte H-3dThd in einem großen Nukleotidpool verdünnt wird. Im Gegensatz dazu findet während der stationären Phase keine Neusynthese von DNA statt, und die beim DNA-turnover oder der DNA-Reparatur aus der DNA herausgetrennten Nukleotide werden über den Salvage Pathway wieder dem Nukleotidpool zugeführt. Da bei diesem Schritt keine Neusynthese von Nukleotiden erforderlich ist, ist bei der Markierung mit H-3dThd die spezifische Aktivität im Nukleotidpool anders.

Beim Vergleich der Zusammensetzung des Nukleotidpools von G<sub>1</sub>- und S-Phase werden bei BHK 21 - und CHO Zellen qualitative und quantitative Unterschiede beschrieben (Kohn 1968, Schaer und Maurer 1968), und bei der Untersuchung der Reparaturaktivität von wachsenden und konfluenten WI-38 Zellen, wurde bei den konfluenten Zellen unter identischen Markierungsbedingungen eine höhere spezifische Aktivität der DNA nachgewiesen (Smith und Hanawalt 1976B). Die höhere spezifische Aktivität im Nukleotidpool während der stationären Phase erklärt den scheinbar hohen Anteil markierter Zellen, beim direkten Vergleich der spezifischen Aktivität. Auch die bei Markierung mit H-3glucose und H-3dThd auftretende Unterschiede (Tab. 3.10) sind darauf zurückzuführen.

Bei der Beobachtung des Ausbaus von H-3 aus der DNA, sinkt die spezifische Aktivität der DNA nach 6 h ab, und erreicht nach 24 h wieder das Ausgangsniveau. Auch dieser Verlauf, kann durch den Abbau von radioaktiv markierten Nukliden aus der DNA, und deren

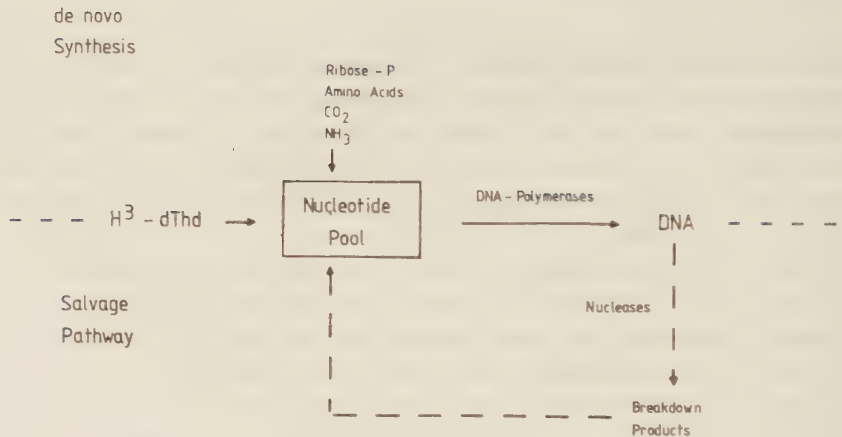


Fig. 4.2. Markierung des Nukleotidpools durch H-3dThd während der de novo Synthese und während der DNA-Reparatur. Bei der de novo Synthese müssen die in die DNA inkorporierten Nukleotide neusynthetisiert werden, während bei der DNA-Reparatur, die aus der DNA herausgetrennten Nukleotide über den Salvage Pathway wieder dem Nukleotidpool zugeführt werden. Dadurch ergeben sich bei der Markierung mit H-3dThd Unterschiede in der spezifischen Aktivität.

Wiederverwendung über den Salvage Pathway erklärt werden. Während der Untersuchung des Ausbaus, ist im Wachstumsmedium keine Radioaktivität nachweisbar.

Allerdings ist bei Verwendung von Hydroxyharnstoff Radioaktivität im Medium vorhanden, und dies zeigt, daß Hydroxyharnstoff kein spezifischer Hemmstoff der RiboNukleotid-Diphosphat Reduktase ist, sondern daß auch andere Prozesse durch Hydroxyharnstoff beeinflußt werden.

Die hohe spezifische Aktivität der DNA bei geringer Serumkonzentration (Fig. 3.14., 3.16, 3.18) kann auch durch eine unterschiedliche Größe des Nukleotidpools erklärt werden, da ein Einfluß der Kulturbedingungen auf die Größe des Nukleotidpools berichtet wird (Collins et al. 1982).

Bei der Untersuchung des Ausbaus der Nuklide aus der DNA von verschiedenen Geweben der Maus (Kap. 3.4.2.2.) findet keine Wiederverwertung der Nukleotide statt, da

- beim Ausbau eine deutliche Abnahme der spezifischen Aktivität der DNA zu beobachten ist (Fig. 3.10.),
- der Nuklidgehalt im Blutplasma sehr schnell abnimmt ( $T_{1/2} = \text{ca. } 4\text{d}$ ) (Halbwertszeit ca. 4 Tage; Ergebnisse nicht dargestellt.).

#### 4.5.6. Immobilisierte Zellen

In Ca-Alginat immobilisierte Zellen sind in keinem stationären Zustand. Während der ersten 5 Tage nach der Immobilisierung verdoppelt sich die Zellzahl, und auch der ermittelte DNA-Gehalt von 13 pg pro Zelle zeigt, daß nicht alle Zellen in  $G_1$ -Phase sind (Fig. 3.22.).

Die Dichtegradientenzentrifugation der zu unterschiedlichen Zeiten nach der Immobilisierung mit H-3BrdU markierten DNA (Fig. 3.33.) zeigt die Existenz replikativer DNA-Synthese während der gesamten Dauer des Experiments. Nach Immobilisierung von Hybridoma Zellen in Agarose Microbeads konnte ebenfalls eine Zunahme der Zellzahl während der ersten 6 Tage beobachtet werden (Nilson et al. 1983).

Die geringe spezifische Aktivität der DNA nach Markierung am Tag 0 im Vergleich zur Markierung am Tag 20, und die geringe G 6-PDH Aktivität am Tag 0 können auf eine Schädigung der Zellen durch die Trypsinierung (Kap. 4.1.) und durch die Immobilisierung zurückgeführt werden. Die durch die Trypsinierung geschädigten Zellen können zum Beispiel durch den relativ hohen Druck beim Herstellen der Kugeln, und durch die 20 min Inkubation in  $\text{CaCl}_2$  zusätzlich geschädigt werden, so daß die zu beobachtende lag-Phase als Erholungsphase angesehen werden kann.

Nach 10 Tagen bleibt die Zellzahl konstant, aber die Ergebnisse der CsCl-Zentrifugation zeigen, daß trotzdem replikative DNA-Synthese stattfindet und somit ein Zustand erreicht ist, bei dem ein steady state zwischen Zellteilung und Zelltod eintritt. Verglichen mit konfluenten Zellen, sind immobilisierte Zellen kein geeigneteres System zur Bestimmung des DNA-turnovers. Beide Systeme zeigen keine vollständige Stationarität und durch CsCl-Zentrifuga-

tion unter alkalischen Bedingungen kann keine vollständige Trennung der parentalen DNA von der durch replikative DNA- Synthesemarkierten DNA erreicht werden (Kap. 4.5.2.2.).

#### 4.5.7. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse im Verlauf und in der Höhe der spezifischen Aktivität der DNA sind nicht einheitlich und im folgenden sollen der Fehlerbereich der Ergebnisse, und die Faktoren, die zu einer Variation dieser Ergebnisse führen, diskutiert werden:

- (i) Die Meßwerte der in Fig. 3.14. - 3.21. dargestellten Experimente sind nicht statistisch abgesichert. Zum Nachweis, daß die beobachteten Variationen außerhalb des experimentellen Meßfehlers liegen, wurde bei einigen Experimenten (Fig. 3.22., 3.23. und 3.25.) jeweils drei Ansätze pro Zeitpunkt analysiert und die Ergebnisse zeigen, daß die ermittelte Standardabweichung in allen Fällen geringer ist als die beobachteten Unterschiede.
- (ii) Die Markierung der DNA mit H-3 von D-[1-H-3]glucose bei BHK 21 und MRC-5 Zellen (Fig. 3.26., 3.27.) bestätigen prinzipiell die mit H-3dThd ermittelten Ergebnisse.

Die Verzögerung beim Einbau in die DNA kann auf den unterschiedlichen Metabolismus von Glucose zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu H-3dThd wird Glucose in mehreren Kompartimenten verdünnt (Zipfel 1980) und aus diesem Grund dauert die Einstellung eines Gleichgewichts in allen Kompartimenten länger als bei H-3dThd.

Dieser unterschiedliche Metabolismus erklärt auch die geringe spezifische Aktivität der DNA bei geringer Serumkonzentration, da die Stoffwechselaktivität bei geringer Serumkonzentration reduziert ist, und der Anteil Glucose der über Glykolyse und Tricarbonsäure Zyklus metabolisiert wird, höher ist.

Die Einbauwerte der einzelnen Versuche können nur relativ miteinander verglichen werden, da verschiedene Faktoren bei den einzelnen Versuchen leicht variieren.

Diese Faktoren sind:

- (i) die Radioaktivität des Wachstumsmediums. Auf Grund des Pipettierfehlers bei der Zugabe geringer Mengen von H-3dThd bzw. C-14dThd zum Wachstumsmedium variiert die Radioaktivität bei den einzelnen Versuchen.
- (ii) Unterschiede in der Serumzusammensetzung. Die Experimente wurden über einen längeren Zeitraum durchgeführt und deshalb wurden verschiedene Serumchargen verwendet. Dies hat einen Einfluß auf den Anteil der stimulierten Zellen (Farber et al. 1971), und ebenfalls wurde bei DNA-Reparaturstudien an konfluenten Zellen bei verschiedenen Serumchargen eine Variation beim Einbau von H-3dThd nachgewiesen, die bis zu 100 % betrug (Smith und Hanawalt 1976B).

Diese Faktoren sind während eines Experimentes konstant, da bei Versuchsbeginn H-3dThd und Serum zu dem gesamten benötigten Medium zugesetzt wurde.

#### 4.5.8. Geschwindigkeit des DNA-turnovers

Die relative Geschwindigkeit des DNA-turnovers ist bei verschiedenen, nicht proliferierenden pro- und eukaryontischen Zellsystemen bestimmt worden, und die einzelnen Werte sind in Tabelle 4.5. zusammengestellt. Die ermittelten Werte schwanken stark und sind vom verwendeten Untersuchungssystem und der Untersuchungsmethode abhängig. Die hohen Geschwindigkeiten können zum Teil durch replikative DNA-Synthese erklärt werden, da mit einer Ausnahme (unstimulierte Lymphozyten) die Stationarität der verwendeten Systeme nicht untersucht wurde. Zusätzlich ist bei der Bestimmung des DNA-turnovers über einen Vergleich der spezifischen Aktivität zu berücksichtigen, daß zwischen dem exponentiellen Wachstum und der stationären Phase Veränderungen im Nukleotidpool auftreten (Kap. 4.5.5.), die zu einer Überschätzung der am DNA-turnover beteiligten DNA führen.

Die bei unstimulierten Lymphozyten ermittelte Geschwindigkeit des DNA-turnovers entspricht der Reparaturrate der spontanen Depurinierungen. Diese Geschwindigkeit ist auf Grund des Ausbaus von H-3 aus der DNA bestimmt worden, und die geringe ermittelte Geschwin-

digkeit ist durch eine Wiederverwendung der Nukleotide über den Salvagepathway zu erklären.

In dieser Arbeit wurde die Existenz und der Umfang des DNA-turnovers mit drei verschiedenen Methoden untersucht, durch

- (i) einen Vergleich der spezifischen Aktivität, der während des exponentiellen Wachstums und der während des konfluenten Stadiums markierten DNA,
- (ii) die Trennung der durch die replikative DNA-Synthese markierten DNA von der parentalen DNA in einem CsCl-Gradienten,
- (iii) den autoradiographischen Nachweis der Markierung auf Zellebene, und einen Vergleich der geschwärzten Silberkörner von schwach und stark markierten Zellen.

Die ermittelte Geschwindigkeit des DNA-turnovers, und der Umfang der daran beteiligten DNA variiert in Abhängigkeit von der verwendeten Methode (Tab. 4.5.).

#### 4.5.8.1. Spezifische Aktivität

Durch einen Vergleich der spezifischen Aktivität der während des exponentiellen Wachstum markierten DNA und der während des konfluenten Stadiums markierten DNA, kann der Anteil der durch DNA-turnover markierten DNA abgeschätzt werden. Wenn eine Korrektur für die durch replikative DNA-Synthese markierte DNA erfolgt<sup>1)</sup>, kann die Geschwindigkeit des DNA-turnovers von 0.1 - 0.6 % pro Genom und h bestimmt werden.

Dabei muß berücksichtigt werden, daß bei der Markierung mit H-3dThd wesentlich größere Unterschiede in der spezifischen Aktivität des Nukleotidpools auftreten, als bei der Markierung mit H-3glucose. Deshalb sollten die mit H-3glucose ermittelten Werte berücksichtigt werden. Die Veränderungen im Nukleotidpool sind nicht quantitativ bestimmt worden, und es ist realistisch anzunehmen, daß während der stationären Phase die Größe des Nukleotidpools reduziert ist, und die spezifische Aktivität deshalb höher ist. Dadurch führt ein Vergleich der spezifischen Aktivität während der beiden Zellzyklusphasen, auch bei Verwendung von H-3glucose zu einer Überschätzung des DNA-turnovers.

<sup>1)</sup> Bei konfluenten Zellen können ca. 75 % des Einbaus auf replikative DNA-Synthese zurückgeführt werden (Tab. 3.12., Kap. 3.5.4.).

| Untersuchungs-<br>system   | Methode                                                                        | Geschwindigkeit<br>des DNA-turn-<br>overs<br><br>[% pro Genom und h] | Anteil der am<br>DNA-turnover<br>beteiligten<br>DNA<br><br>[%] | Referenz                  |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <u>Bakterien</u>           |                                                                                |                                                                      |                                                                |                           |
| E. coli                    | Markierung der DNA mit H-3BrdU, Trennung im CsCl Gradienten                    | 0.04                                                                 |                                                                | Grivell et al. 1975       |
| E. coli                    | Einbau von H-3dThd in die DNA                                                  | 0.33                                                                 |                                                                | Tang et al. 1979          |
| <u>Pflanzen</u>            |                                                                                |                                                                      |                                                                |                           |
| Erbse                      | Markierung der DNA mit H-3BrdU, Trennung im CsCl Gradienten                    | 1.00                                                                 |                                                                | Bryant et al. 1974        |
| <u>Maus</u>                |                                                                                |                                                                      |                                                                |                           |
| Adrenal Medulla            | Autoradiographie                                                               | 0.75                                                                 |                                                                | Pelc und Viola Magni 1969 |
| Muskel                     | Einbau von H-3dThd in die DNA                                                  | 1.84                                                                 | 40                                                             | Stroun et al. 1967        |
|                            | Ausbau von H-3 aus der DNA                                                     | 0.40                                                                 | 75                                                             | Tab. 3.6.                 |
| Milz                       | Ausbau von H-3 aus der DNA                                                     | 0.30                                                                 | 65                                                             | Tab. 3.6.                 |
| Pancreas                   | Ausbau von H-3 aus der DNA                                                     | 0.64                                                                 | 79                                                             | Tab. 3.6.                 |
| Gehirn                     | Ausbau von H-3 aus der DNA                                                     | 0.30                                                                 | 70                                                             | Kimberlin et al. 1974     |
| <u>Zellen in vitro</u>     |                                                                                |                                                                      |                                                                |                           |
| Lymphozyten (unstimuliert) | Ausbau von H-3 aus der DNA                                                     | 0.001 <sup>1)</sup>                                                  |                                                                | Dittmer 1983              |
| CHO                        | Einbau von H-3dThd in die DNA                                                  | 0.42                                                                 |                                                                | Hahn et al. 1968          |
| BHK 21                     | Vergleich der Spezifischen Aktivität nach Markierung mit H-3dThd               | 0.55 <sup>2)</sup>                                                   | 13.2 <sup>2)</sup>                                             | Tab. 3.10.                |
| CHO                        | —"                                                                             | 0.66 <sup>2)</sup>                                                   | 15.8 <sup>2)</sup>                                             | Tab. 3.10.                |
| BHK 21                     | Vergleich der spezifischen Aktivität nach Markierung mit H-3glucose 20 % Serum | 0.28 <sup>2)</sup>                                                   | 6.7 <sup>2)</sup>                                              | Tab. 3.10.                |
|                            | 0.5% Serum                                                                     | 0.12 <sup>2)</sup>                                                   | 2.9 <sup>2)</sup>                                              | Tab. 3.10.                |
| MRC-5                      | —" 20 % Serum                                                                  | 0.36 <sup>2)</sup>                                                   | 8.6 <sup>2)</sup>                                              | Tab. 3.10.                |
|                            | —" 0.5% Serum                                                                  | 0.28 <sup>2)</sup>                                                   | 6.7 <sup>2)</sup>                                              | Tab. 3.10.                |
| BHK 21                     | Markierung der DNA mit H-3BrdU und Trennung im CsCl Gradienten, +MW            |                                                                      |                                                                |                           |
|                            | —" + MW, + HU                                                                  |                                                                      | 4                                                              | Tab. 3.11.                |
|                            | —" - MW                                                                        |                                                                      | 44                                                             | Tab. 3.11.                |
|                            | —" - MW                                                                        |                                                                      | 6                                                              | Tab. 3.11.                |
| BHK 21                     | Autoradiographie + MW                                                          | 1.07                                                                 | 20                                                             | Tab. 3.12.                |
|                            | —" + MW, + HU                                                                  | 0.71                                                                 | 39                                                             | Tab. 3.12.                |
|                            | —" - MW                                                                        | 0.54                                                                 | 25                                                             | Tab. 3.12.                |
| Säuger Zellen              | Spontane Depurierung                                                           | 0.001                                                                |                                                                | Lindahl und Nyberg 1972.  |

- 1) korrigiert im den Anteil der Zellen, die replikative DNA-synthese durchführen.
- 2) Vergleich der spezifischen Aktivität der DNA, der während des exponentiellen Wachstums, und während der konfluenten Phase markierten Zellen. Da bei konfluenten Zellen 75 % der Markierung auf replikative DNA-Synthese zurückzuführen sind (Kap. 3.5.4.) wurden die Daten um diesen Wert korrigiert.
- Tab. 4.5. Relative Geschwindigkeit des DNA-turnovers bei verschiedenen nichtteilenden, pro- und eukaryontischen Zellen.

#### 4.5.8.2. CsCl-Gradienten Zentrifugation

Die Trennung der gesamten zellulären DNA im CsCl-Gradienten erlaubt nur eine Aussage über den gesamten Anteil der am DNA-turnover beteiligten DNA.

Ein direkter Vergleich zwischen stark markierten und schwach markierten Zellen ist nicht möglich.

#### 4.5.8.3. Autoradiographie

Ein Vergleich der Silberkornzahl der durch DNA-turnover und durch replikative DNA-Synthese markierten Zellen führt zu einer relativ hohen Geschwindigkeit des DNA-turnovers.

Dabei muß berücksichtigt werden, daß

- bei den stark markierten Zellen die Markierung im Sättigungsbe-  
reich liegt und die Anzahl der Silberkörner nur geschätzt wer-  
den kann. In dieser Arbeit war die Markierung der stark markier-  
ten Zellen etwa das 12 fache der schwach markierten Zellen, wäh-  
rend bei anderen Studien eine 50 fach stärkere Markierung beob-  
achtet wurde (Pelc 1962),
- die Markierungsdauer von 8 h nicht für eine Markierung während  
der gesamten S-Phase ausreicht (Dauer der G<sub>1</sub> und S-Phase zusam-  
men ca. 14 h).

Diese Faktoren führen zu einer Überschätzung der relativen Geschwin-  
digkeit des DNA-turnovers. Dies zeigt sich auch durch einen  
Vergleich der durch Autoradiographie und mit CsCl-Zentrifugation  
ermittelten Anteils des am DNA-turnover beteiligten DNA.

Bei der autoradiographischen Auswertung beträgt der Anteil ca 20 %, während bei der Trennung der DNA im CsCl-Gradienten nur 4 % der DNA am DNA-turnover beteiligt zu sein scheinen.

Da die autoradiographische Auswertung zu einer starken Überschät-  
zung des DNA-turnovers führt, sind die durch einen Vergleich nach  
H-3glucose Markierung ermittelten Werte zuverlässiger. Da aber auch  
diese Werte zu einer leichten Überschätzung führen, kann die Ge-  
schwindigkeit des DNA-turnovers auf maximal 0.1 % pro Genom und h  
geschätzt werden

Während die Existenz von spontanen DNA-Schäden wie Desaminierung, Depurinierung, Depyrimidierung, das Auftreten von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und andere spontane DNA-Veränderungen bekannt sind (Grossman 1981, Kornberg 1980) ist nur für die spontane Desaminierung und die spontane Hydrolyse der glykosidischen Bindung die Geschwindigkeitskonstante bekannt (Lindahl und Nyberg 1972, 1974). Diese spontanen Veränderungen führen im Genom einer Säugerzelle ( $10.3 \text{ pg} \hat{=} 2 \cdot 10^{10}$  Nukleotide) zu ca. 2500 Veränderungen pro h.

Vorausgesetzt, daß ca. 100 Nukleotide durch die Reparatur eines DNA-Schadens ersetzt werden (Hanawalt et al. 1979) wird durch die Reparatur dieser Schäden etwa 0.001 % der gesamten zellulären DNA pro h ersetzt.

Aus einer relativen Geschwindigkeit des DNA-turnovers von 0.1 % pro Genom und h, kann unter der Voraussetzung, daß DNA-turnover ausschließlich auf die Reparatur von spontanen DNA-Schäden zurückgeführt ist, die Anzahl der DNA-Schäden berechnet werden:

ca.  $2.5 \cdot 10^5$  DNA-Schäden pro h würden einen DNA-turnover von dem beobachteten Umfang induzieren.

Ein Wert von  $2 \cdot 10^5$  DNA-Schäden pro Genom und h ist das 100 fache der für spontane Depurinierungen beschriebenen Wertes, und erscheint realistisch auf Grund der Vielzahl der möglichen DNA-Veränderungen und der Komplexität des eukaryontischen Genoms.

#### 4.5.9. Biologische Mechanismen des DNA-turnovers

DNA-turnover ist die vom Zellzyklus unabhängige, kontinuierliche DNA-Synthese, bei der Teile der zellulären DNA erneuert werden.

Im Gegensatz zur replikativen DNA-Synthese, während der S-Phase, bei der sich der DNA-Gehalt einer Zelle verdoppelt, erfolgt beim DNA-turnover keine, bzw. nur eine sehr geringe Zunahme des DNA-Gehalts einer Zelle.

Die existierenden Nachweise für einen DNA-turnover beruhen auf autoradiographischen und biochemischen Methoden, die keine Charakterisierung der zu Grunde liegenden Mechanismen und der beteiligten DNA-Sequenzen erlauben. Deshalb sind die beiden existierenden

Modelle zur Erklärung der biologischen Funktion des DNA-turnovers spekulativ:

- (i) In einem Modell wird DNA-turnover durch die Existenz einer sogenannten metabolen DNA erklärt, die bei Säugerzellen im Zusammenhang mit der Proteinsynthese steht, und als 'working DNA' starken mechanischen Kräften ausgesetzt ist und deshalb periodisch erneuert werden muß (Pelc 1968, 1972). Durch diese Amplifikation von definierten, an der Transkription beteiligten DNA-Sequenzen soll eine höhere Stabilität der nicht an der Transkription beteiligten genetischen DNA erreicht werden.
- (ii) Eine andere Erklärung für die Existenz einer metabolen DNA liefert die sogenannte 'Ticket Hypothese'. Sie postuliert, daß auf DNA-Ebene zusätzliche Kontrollsequenzen am Ende eines Gens vorhanden sind, die sowohl die Transkriptions-, als auch die Translationsrate eines Gens bestimmen (Guille und Que-  
tier 1973). Diese tickets sollen aus einer Sequenz von mehreren Nukleotiden bestehen, und da diese tickets mehrfach vorhanden sein müssen, sollen sie den im Genom vorhandenen repetitiven Sequenzen entsprechen.

Das diesen Modellen zu Grunde liegende statische Modell der DNA hat sich in den letzten Jahren stark verändert, und neben der Analyse von verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen (Lehman und Karran 1981, Hanawalt et al. 1979) und dem Nachweis von spontanen DNA-Schäden (Lindahl 1982) ist durch den Einsatz gentechnologischer Methoden ein dynamischeres Modell der DNA entstanden (Watson et al. 1983). Dieses dynamischere Modell steht in deutlichem Widerspruch zu einer postulierten DNA-Stabilität, die fordert, daß einmal synthetisiert (oder markierte) DNA nur durch Zelltod verloren und degradiert werden kann (Cleaver 1967) (Kap. 1.1.).

Bei eukaryontischen, nicht teilenden Zellen sind verschiedene Mechanismen beschrieben (Kap. 1.1.1.) die zu vorübergehenden oder permanenten Veränderungen der DNA führen. Die Summe dieser DNA-Veränderungen kann als DNA-turnover beobachtet werden und folgende biologische Mechanismen können daran beteiligt sein.

#### 4.5.9.1. Reparierbare DNA-Veränderungen

Die DNA aller Zellen ist in vivo ständig Veränderungen ausgesetzt, und die Existenz der verschiedenen Reparaturmechanismen zeigt, daß die Reparatur dieser DNA-Schäden notwendig ist.

Die Existenz und die Geschwindigkeitskonstanten sind nur nachgewiesen für spontane DNA-Veränderungen wie Depurinierung, Depyrimidierung und Desaminierung, wobei diese Veränderungen jeweils durch spezifische Reparaturenzyme erkannt werden.

Für zusätzliche DNA-Schäden , wie zum Beispiel:

- (i) Einzel- oder Doppelstrangbrüche,
- (ii) Thymidindimere
- (iii) DNA-DNA- , und DNA-RNA Vernetzungen,
- (iv) DNA-Protein Vernetzungen

sind ebenfalls spezifische Reparaturenzyme bekannt. Aber die Geschwindigkeitskonstanten für das spontane Auftreten diesen Schäden sind nicht bekannt.

Neben spontane DNA-Schäden können Strangbrüche in der DNA auch durch die Entspiralisierung der DNA durch Helicasen während der Replikation und Transkription entstehen. Durch Hemmung der Transkription wurde eine Reduktion des DNA-turnovers bei *E. coli* (Grivell et al. 1975) und bei unstimulierten Lymphozyten (Aki-jeff und Aingorn 1972) beobachtet.

Durch DNase I Verdauung der reparierten DNA wurde nachgewiesen, daß die DNA-Reparatur an dekondensiertem Chromatin stattfindet (Smerdon et al. 1978, Smerdon und Lieberman 1980). Da die Hemmung der DNA-Topoisomerasen nur zu einer geringen Hemmung des DNA-turnovers führt, kann vermutet werden, daß die am DNA-turnover beteiligten DNA-Bereiche dekonsiert vorliegen. Dies könnte durch DNase I Verdauung der durch DNA-turnover markierten DNA bestätigt werden.

#### 4.5.9.2. Permanente DNA-Veränderungen

Durch gentechnologische Methoden sind bei Eukaryonten verschiedene Mechanismen nachgewiesen (Kap. 1.1.1.2.), die bei dem gewählten experimentellen Design als DNA-turnover beobachtet werden können. Bei der Integration exogener DNA in die Rezipienten-DNA, bzw. bei der Integration transponierbarer Elemente ist der Integrationsmechanismus unbekannt. Es ist anzunehmen, daß bei den Integrationsstellen, ähnlich wie bei der DNA-Reparatur, einzelsträngige DNA-Bereiche existieren, die durch DNA-Polymerasen und durch Ligasen geschlossen werden. Diese Mechanismen können als DNA-turnover beobachtet werden. Über die Größe der einzelsträngigen DNA-Bereiche im eukaryontischen Genom bzw. über die Häufigkeit von Transpositionen bei Säugerzellen liegen keine Angaben vor.

Während der verschiedenen Zellzyklusphasen existiert ein unterschiedlicher Bedarf an spezifischen Genprodukten, und es ist denkbar, daß die Amplifikation von definierten Genen durch die Verarmung des Wachstumsmedium mit essentiellen Nährstoffen, oder durch den Übergang von  $G_1$  nach  $G_0$  induziert wird.

Die Frage nach Genamplifikation während des Übergangs von  $G_1$  nach  $G_0$  ist spekulativ, aber auch schon in früheren Modellen wurde ein Zusammenhang zwischen Genamplifikation und DNA-turnover postuliert (Pelc 1972).

Bei der Genamplifikation findet eine leichte Zunahme des DNA-Gehalts statt. Diese Zunahme ist allerdings so gering, daß sie mit der in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden kann.

#### 4.5.9.3. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde mit biochemischen und autoradiographischen Methoden die Existenz und die Geschwindigkeit des DNA-turnovers untersucht.

Weitere Untersuchungen des DNA-turnovers sollten an konfluenten Zellkulturen durchgeführt werden, da die nicht proliferierenden Gewebe (Muskel, Pankreas, Gehirn) ein inhomogenes Zellsystem darstellen, und der beobachtete DNA-turnover auch durch Zellwanderung erklärt werden könnte.

Auch bei den verwendeten konfluenten Zellen konnte am achten Tag nach dem Einimpfen replikative DNA-Synthese nachgewiesen werden, wodurch die Bestimmung des Anteils der durch DNA-turnover markierten DNA erschwert wird. Für weitere Untersuchungen muß die Stationarität des Zellsystems bezüglich Zellteilung, bzw. replikativer DNA-synthese genau charakterisiert werden. Es muß ein Zellsystem eingesetzt werden, in dem keine Zellteilung mehr stattfindet, oder bei dem die replikative DNA-synthese minimal ist und dieser Anteil exakt bestimmt werden kann. Swiss 3T3 bzw. WI-38 Zellen könnten ein geeignetes stationäres System darstellen, da in stationärem Zustand nur 1 % (Roengurt und Sinnett-Smith 1983) bzw. 0.5 % (Farber et al. 1971) der Zellen deutlich mit H-3dThd markiert werden können.

Die Stationarität eines Zellsystems kann durch Autoradiographie oder durch Impulszytophotometrie nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit nur mit Zellen in  $G_1$  bzw.  $G_0$  Phase zu arbeiten, kann durch Trennung der Zellen mit einem Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) erreicht werden. Nach dem Trypsinieren werden die Zellen sortiert und nur die Zellen, die sich in  $G_1$  bzw.  $G_0$  Phase befinden werden weiter analysiert.

Da die spezifische Aktivität des Nukleotidpools während der verschiedenen Zellzyklusphasen variiert, kann der Umfang des DNA-turnovers nicht exakt durch einen Vergleich der spezifischen Aktivität der während der verschiedenen Wachstumsphasen markierten DNA bestimmt werden. Deshalb ist eine quantitative Bestimmung des Nukleotidpools während der verschiedenen Zellzyklusphasen, in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, notwendig.

Dies ist nicht nur für die Bestimmung des DNA-turnovers von Bedeutung, sondern auch für die genaue Charakterisierung der DNA-Replikation

(Mathews und Sinha 1982). Dabei könnte die bisher verwendete enzymatische Nachweismethode (Lindberg und Skoog 1970) durch HPLC-Trennung ersetzt werden, wodurch die 'de novo' Synthese der Nukleotide und eine mögliche Kompartimentierung der NTP-Pools (Reddy und Pardee 1980) einfacher bestimmt werden kann.

Die Existenz und die Geschwindigkeit von spontanen DNA-Schäden sollte in einem zellfreien System bestimmt werden. Dadurch kann geklärt werden, in welchem Umfang DNA-turnover auf die Reparatur von spontanen DNA-Schäden zurückgeführt werden kann und in welchem Maße andere Mechanismen von Bedeutung sind.

In welchem Maße die für die DNA-Veränderung beschriebenen Mechanismen (Kap. 1.1.1.2.) am DNA-turnover beteiligt sind, kann mit gentechnologischen Methoden untersucht werden.

Die Existenz von transponierbaren Elementen und der 'promiscuous DNA' sind bei eukaryontischen Zellen beschrieben, aber bei Säugerzellen noch nicht direkt nachgewiesen worden. Deshalb ist auch die Häufigkeit dieser Vorgänge unbekannt.

Die Existenz von Genamplifikation während der  $G_1$  bzw.  $G_0$  Phase kann durch die Methode der Hybrid Selektion untersucht werden (Hedrick et al. 1984, Saito et al. 1984). Dabei wird die mRNA von stationären Zellen in cDNA revers transkribiert und gegen die isolierte mRNA von exponentiell wachsenden Zellen hybridisiert. Die für die  $G_1$  bzw.  $G_0$  Phase spezifischen Zellen hybridisieren nicht und können durch Hydroxylapatit Chromatographie von den hybridisierten doppelsträngigen Molekülen getrennt werden und zum Screenen einer erstellten DNA-Bibliothek und zur weiteren Charakterisierung benutzt werden.

## 5. Literatur

- Adrian, E.K. (1971): The Metabolic Stability of Nuclear DNA. In Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body. Cameron, I.L. and Thrasher, J.D. (Edts.). Academic Press
- Akijev, A.P. und Aingorn, E.D. (1972): DNA-synthesis related to genom activation in human Lymphocytes cultured in vivo. Exp. Cell Res. 75, 369 - 378
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (1983): Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. New York, London.
- Anker, P., Jachertz, D., Stroun, M., Brögger, R., Lederrey, C., Henri, J. und Maurice, P.A. (1980) The role of extracellular DNA in the Transfer of Information from T to B human Lymphocytes in the course of an immune response. J. Immunogen. 7, 475 - 481
- Augenlicht, L.H. und Baserga, R. (1974): Changes in the G<sub>0</sub> State of WI-38 Fibroblasts at Different Times after Confluence. Exp. Cell Res. 89, 255 - 262
- Ayad, S.R. und Fox, M. (1968): DNA Uptake by a Mutant Strain of Lymphoma Cells. Nature 220, 35 - 38
- Bacchetti, S. und Graham, F.L. (1977): Transfer of the Gene for Thymidinekinase to thymidinekinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 74, 1590 - 1594
- Balinska, M., Samsonoff, W.A. und Galivan, J. (1982): Reversibly Permeable Hepatoma Cells in Culture. Biochim. Biophys. Acta 721, 253 - 261
- Bartholomew, J.F., Neff, N.T. und Ross, P.A. (1976): Stimulation of WI-38 Cell Cycle Transit: Effect of Serum Concentration and Cell Density. J. Cell Physiol. 89, 251 - 258
- Baserga, R. (1978): Resting Cells and the G<sub>1</sub> Phase of the Cell Cycle. J. Cell. Physiol. 95, 377 - 386
- Bermudez, E. (1982): The Inhibition of DNA Repair in Primary Rat Hepatocyte Cultures by Aphidicolin: Evidence for the Involvement of alpha Polymerase in the Repair Process. Biochem. Biophys. Res. Com. 109, 275 - 281
- Bernheim, J.L. und Mendelsohn, J. (1978): DNA Synthesis and Proliferation of Human Lymphocytes in vitro: II Characterization of the DNA Newly Synthesized after Phythemagglutinin Stimulation. J. Immunol. 120, 963 - 970
- Bernstein, L.B., Mount, S.B. und Weiner, A.M. (1983): Pseudogenes for Human Small Nuclear RNA U3 Appear to arise by Integration of Self-Primed Reverse Transcripts of the RNA into New Chromosomal Sites. Cell 32, 461 - 472
- Boehringer (1977): Test Combination G 6-PDH, Boehringer GmbH, Mannheim.
- Bombik, B.M. und Baserga, R. (1976): Effect of Cyclic AMP on Chromatin-bound Protein Kinases in WI-38 Fibroblasts stimulated to Proliferate, Biochim. Biophys. Acta 442, 343 - 357
- Bond, V.P. und Feinendegen, L.E. (1966): Intracellular H-3-Thymidine: Dosimetric, Radiobiological and Radiation Protection Aspects. Health Physics 12, 1007 - 1020

- Bonka, H. (1980): Berechnung der Dosiswerte nach dem spezifischen Aktivitätsmodell für Tritium und Kohlenstoff 14. In: Strahlenschutzprobleme im Zusammenhang mit der Verwendung von Tritium und Kohlenstoff-14 und ihren Verbindungen. Stieve, F.E. und Kistner, G. (Hrg.) STH-Berichte - Schriftenreihe des Instituts für Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamts 12/1980.
- Bowden, G.T., Trosko, J.E., Shapas, B.G. und Boutwell, R.K. (1975): Excision of Pyrimidine Dimers from Epidermal DNA and nonsemi-conservative DNA-Synthesis following Ultraviolet Irradiation of Mouse Skin. Cancer Res. 35, 3599 - 3607
- Brinster, R.L., Ritchie, K.A., Hammer, R.E., O'Brian, R.L., Arp, B. und Storb, U. (1983): Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the Spleen of transgenic mice. Nature 306, 332 - 336
- Bryant, J.A., Wildon, D.C. und Wong, D. (1974): Metabolically labile DNA in aseptically grown Seedlings of Pisum sativum L.. Planta 118, 17 - 24
- Cadet, J., Gentner, N.E., Rozgo, B. und Peterson, M.C. (1983): Rapid Quantitation of Ultraviolet-induced Thymine-containing Dimers in human cell DNA by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. J. Chrom. 280, 99 - 108
- Cameron, I.L. (1971): Cell Proliferation and Renewal in the Mammalian Body. In: Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body. Cameron, I.L. und Thrasher, J.D. (Edts.). Academic Press, New York.
- Cameron, I.L., Pool, M.R.H. und Houge, T.R. (1979): Low Level Incorporation of Tritiated Thymidine into the nuclear DNA of Purkinje Neurons of Adult Mice. Cell Tissue Kinet. 12, 445 - 451
- Capecchi, M.R. (1980): High Efficiency Transformation by Direct Microinjection of DNA in Cultured Mammalian Cells. Cell 12, 479 - 488
- Clarkson, J.M. und Mitchell, D.L. (1983): The Effect of Various Inhibitors of DNA-synthesis on the Repair on DNA Photoproducts. Biochim. Biophys. Acta 740, 355 - 361
- Cleaver, J.E. (1967): Thymidine Metabolism and Cell Kinetics. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Cleaver, J.E. (1971): Repair of Alkylation Damage in Ultraviolet-Sensitive (Xeroderma Pigmentosum) Human Cells. Mutat. Res. 12, 453 - 462
- Cleaver, J.E. (1974): Repair Processes for Photochemical Damage in Mammalian Cells. Adv. Radiat. Res. 4, 1 - 72
- Cleaver, J.E. (1978): DNA Repair and its coupling to DNA Replication in Eukaryotic Cells. Biochim. Biophys. Acta 516, 489 - 516
- Cline, M.J., Stang, H., Mercola, K., Morse, L., Ruprecht, R., Browne, J. und Salser, W. (1980): Gene transfer in intact animals. Nature 284, 422 - 425
- Collins, A.R.S., Squires, S. und Johnson, R.T. (1982): Inhibitors of repair DNA-synthesis. Nucl. Acids Res. 10, 1203 - 1213

- Collins, M. und Rubin, G.M. (1984): Structure of chromosomal rearrangements induced by the FB transposable element in *Drosophila*. *Nature* 308, 323 - 327
- Commerford, S.L., Carsten, A.L. und Cronkite, E.P. (1977): The Distribution of Tritium in the Glycogen, Hemoglobin, and Chromatin of Mice receiving Tritium in their drinking water. *Radiat. Res.* 72, 333 - 342
- Commerford, S.L., Carsten, A.L. und Cronkite, E.P. (1982A): The turnover of Tritium in Cell Nuclei, Chromatin, DNA and Histone. *Radiat. Res.* 92, 521 - 529
- Commerford, S.L., Carsten, A.L. und Cronkite, E.P. (1982B): Histone turnover within nonproliferating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 79, 1163 - 1165
- Commerford, S.L., Carsten, A.L. und Cronkite, E.P. (1983): The Distribution of Tritium among the Amino Acids of Proteins obtained from Mice exposed to tritiated water. *Radiat. Res.* 94, 151 - 155
- Cox, R.A. und Gokcen, M. (1976): Comparison of Serum, Native DNA-Binding and Deoxyribonuclease levels in ten animal species and man. *Life Sciences* 19, 1609 - 1614
- Coyle, M.B. und Strauss, B. (1970): Cell killing and the Accumulation of Breaks in the DNA of Hep-2 Cells incubated in the Presence of Hydroxyurea. *Cancer Res.* 30, 2314 - 2319
- Dell'Orco, R.T., Mertens, J.G. und Kruse, P.F. (1973): Doubling Potential, Calendar time and Senescence of human diploid cells in culture. *Exp. Cell Res.* 77, 356 - 360
- Demple, B. und Karran, P. (1983): Death of an enzyme: Suicide repair of DNA. *TIBS* 8, 137 - 139
- Deutsch, W.A. und Linns, S. (1979): DNA-binding activity from cultures human fibroblasts that is specific for partially depurinated DNA and that inserts purins into apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 76, 141 - 144
- Dittmer, J. (1983): Untersuchungen zur Frage der metabolen Stabilität der DNA am Beispiel unstimulierter Lymphozyten. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Dittmer, J., Zipfel, P.F., Telle, W. und Kasche, V. (1984): Lysis and Permeabilization of Cultured Animal Cells by Proteolytic Enzymes. Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie 365, 980
- Eick, D., Fritz, H.J. und Doerfler, W. (1983): Quantitative determination of 5-Methylcytosine in DNA by Reversed-Phase-High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 135, 165- 171
- Erixon, K. und Ahnström, G. (1979): Single Strand breaks in DNA during repair of UV induced damage in normal human and Xeroderma Pigmentosum cells as determined by alkali DNA unwinding and Hydroxylapatite chromatography. Effect of Hydroxyurea, 5-Fluorodeoxyuridine and 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine on the kinetics of repair. *Mutat. Res.* 59, 257 - 271
- Farber, J., Rovera, G. und Baserga, R. (1971): Template Activity of Chromatin during Stimulation of Cellular Proliferation in Human Diploid Fibroblasts. *Biochem. J.* 122, 189 - 195

- Fasman, G.D. (1975): Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Nucleic Acids-Volume I, 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, Cleveland Ohio.
- Fournier, R.E.K. und Ruddle, F.H. (1977): Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese Hamster, and human somatic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (US). 74, 319 - 323
- Furcht, L.T. und Wendelschafer-Crabb, G. (1978): Trypsin induced co-ordinate Alterations in cell shape, Cytoskeleton and Intrinsic Membrane Structure of Contact Inhibited Cells. Exp. Cell Res. 114, 1 - 14.
- Furcht, L.T., Mosher, D.F. und Wendelschafer-Crabb, G. (1978): Immunocytochemical Localization of Fibronectin (LETS Protein) on the Surface of L 6 Myoblasts. Light and Electron Microscopic Studies. Cell 13, 263 - 271
- Gautschi, J.R., Young, B.R. und Painter, R.B. (1972): Evidence for Repair Replication in unirradiated Mammalian Cells-Is it an artefact ?. Biochim. Biophys. Acta 281, 324 - 328
- Geck, P. und Nasz, I. (1983): Concentrated, Digestible DNA after Hydroxylapatite Chromatography with Cetylpyridinium Bromide Preparation. Anal. Biochem. 135, 264 - 268
- Gerber, G., Gerber, G. und Altman, K.I. (1966): The Catabolism of Tissue Nucleic Acid in Rat. I The Replacement time of Deoxyribonucleic Acids. J. Biol. Chem. 235, 1433 - 1436
- Gerber, G.B. und Maes, J. (1981): Incorporation and Turnover of Tritium in Neonatal Mice and their Mothers after Feeding Tritiated Thymidine during Pregnancy. Health Physics 40, 755 - 759
- Giulotto, E. und Israel, N. (1984): DNA-Mediated Gene Transfer is more efficient during S-Phase of the Cell Cycle. Biochem. Biophys. Res. Com. 118, 310 - 316
- Glover, D., Zaha, A., Stocker, A., Santelli, R., Puego, M., Toledo, S. und Lara, F. (1982): Gene amplification in Rhyrczoscicara salivary gland chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 79, 2947-2951
- Gorman, C., Padmanabhan, R., Howard, B.H. (1983): High Efficiency DNA-Mediated Transformation of Primate Cells. Science 221, 551 - 553
- Graham, F.L. und VanderErb, A.J. (1973): A New technique for the assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. Virology 52, 456 - 467
- Grivell, A.P., Grivell, M.B. und Hanawalt, P.C. (1975): Turnover in bacterial DNA containing Thymine or 5-Bromouracil. J. Mol. Biol. 98, 219 - 233
- Grossman, L. (1981): Enzymes involved in the Repair of Damaged DNA. Arch. Biochem. Biophys. 211, 511 - 522
- Grossman, L. und Graftstrom, R. (1982): AP sites and AP endonucleases. Biochimie 64, 577 - 580
- Guille, E. und Quetier, F. (1973): Heterochromatin, Redundant DNA and metabolic DNA's: A new Hypothesis about their structure and Function. Prog. Biophys. Mol. Biol. 27, 123 - 142

- Gurdon, J.B. und Melton, D.A. (1981): Gene transfer in Amphibian Eggs and Oocytes. *Ann. Rev. Genet.* 15, 189 - 218
- Hackett, P. und Hanawalt, P.C. (1966): Selectivity for Thymine over 5'Bromouracil by a Thymine Requirering Bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* 123, 356 - 363
- Hahn, G.M. Steward, J.R., Yang, S.J., Parker, V. (1968): Chines Hamster Cell Monolayer Cultures. I Changes in Celldynamik and modifications of the cell cycle with the period of growth. *Exp. Cell Res.* 49, 285 - 292
- Hahn, G.M. und Little, J.B. (1972): Plateau-Phase Cultures of Mammalian Cells: An invitro model for human cancer. *Curr. Topics in Radiat. Res. Quaterly* 8, 39 - 83
- Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. und Smith, C.A. (1979): DNA Repair in Bacteria and Mammalian Cells. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 783 - 836
- Hatch, F.T. und Mazrimas, J.A. (1972): Tritiation of Animals from tritiated Water. *Radiat. Res.* 50, 339 - 357
- Heby, Ø., Marton, L.J., Zardi, L., Russell, D.H. und Baserga, R. (1975): Changes in Polyamine Metabolism in WI-38 Cells stimulated to proliferate. *Exp. Cell. Res.* 90, 8 - 14
- Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielson, E.A. und Davies, M.M. (1984): Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane associated proteins. *Nature* 308, 149 - 153
- Higashi, K., Narayanan, K.S., Adams, L. und Busch, H. (1966): Utilazation of the Citric Acid Procedure and Zonal Centrifugation for Mass Isolation of Nuclear RNA fram Walker 256 Carcinosarcoma. *Cancer Res.* 26, 1582 - 1587
- Hill, J. und Huppert, J. (1970): Fate of exogenous Mouse DNA in Chicken Fibroblasts in vitro nonconservative Preservation. *Biochim. Biophys. Acta.* 213, 26 - 35
- Hirschmann, S.Z. und Felsenfeld, G. (1966): Determination of DNA Composition and Concnetration by Spectral Analysis. *J. Mol. Biol.* 16, 347 - 356
- Hodges, G.M., Livingston, D.C. und Franks, L.M. (1973): The Localization of Trypsin in cultured Mammalian Cells. *J. Cell. Sci.* 12, 887 - 902
- Holliday, R., Huschtscha, L.I. und Kirkwood, T.B.L. (1981): Cellular Aging: Further Evidence for the Commitment Theory. *Nature* 213, 1505 - 1508
- Howard-Flanders, P., West, S.C. und Stasiak, A. (1984): Role of Rec A protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature* 309, 215 - 220.
- ICRP (1975): Report of the task group on Reference Man. Publication No. 23. Pergamon Press, Ltd. Oxford, New York, Frankfurt.
- ICRP (1979): Limits for Intake of Radionuclides by Workers. Publication No. 30. Pergamon Press, Ltd. Oxford, New York, Frankfurt.
- Ikushima, T., Benz, R.D. und Carsten, A.L. (1984): Sister Chromatid Exchanges in bone marrow cells of mice maintained in tritiated water. *Int. J. Radiat. Res.* 45, 251 - 256

- Jagadeswarra, P., Forget, B.G. und Weissman, S.M. (1981): Short Interspersed repetitive DNA-elements in Eukaryotes: Transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA Pol III Transcripts. *Cell* 26, 141 - 152
- Johansson, K.J. und Lundquist, H. (1972): A Pitfall in the use of Polyethylene Vials in Liquid Scintillation Counting. *Anal. Biochem.* 50, 47 - 49
- Johnston, R.N., Beverley, S.M. und Schinke, R.T. (1983): Rapid spontaneous dihydrofolate reductase Gene Amplification shown by Fluorescence activated cell Sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 80, 3711 - 3715
- Juliano, R.L. und Gagelang, E. (1977): The Adhesion of Chinese Hamster Cells. I Effect of Temperature, Metabolic Inhibitors and Proteolytic Dissection of Cell Surface Macromolecules. *J. Cell. Phys.* 92, 209 - 220
- Kao, P.C., Regan, J.D. und Volkin, E. (1973): Fate of exogenous and heterologous DNA after Incorporation into human skin fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 324, 1 - 13
- Kasche, V., Zöllner, R., Amneus, H., und Näslund, L. (1978): A rapid and Quantitative Method to determine the Tritium Content in DNA from small Tissue Samples. IAEA International Symposium on the Behavior of Tritium in the Environment. Oct. 16 - 20, 1978, San Francisco, USA.
- Kasche, V., Probst, K. und Maas, J. (1981A): Nucleic Acids in Trypsin used to trypsinize. *Cell. Biol. Int. Rep.* 5, 1
- Kasche, V., Zöllner, R., Amneus, H. und Näslund, L. (1981B): A two step procedure for quantitative isolation of pure and double strand DNA from animal tissues and cell cultures. *Prep. Biochem.* 11, 232 - 250
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, Ch.D. und Leder, P. (1983): Cell-specific Regulation of the c-myc Gene by Lymphocyte Mitogens and Platelet-Derived Growth Factor. *Cell* 35, 603 - 610
- Kimberlin, R.H., Shirt, D.B. und Collis, S.C. (1974): The turnover of isotopically labeled DNA in vivo in developing, adult and scrapie affected Mouse Brain. *J. Neurochem.* 23, 241 - 248
- Klobutcher, L.A., Miller, C.L. und Ruddle, F.H. (1980): Chromosome mediated gene transfer results in two classes of unstable transformants. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 77, 3610 - 3614
- Knauer, D.J. und Cunningham, D.D. (1984): Protease Nexin: Cell secreted proteins which regulate extracellular serine proteases. *TIBS* 9, 231 - 233
- Knippers, R. (1982): *Molekulare Genetik*. G. Thieme Verlag, Stuttgart
- Kohn, A. (1968): Thymidine Metabolism and DNA-synthesis in crowded monolayers of Animal Cells. *Exp. Cell Res.* 52, 161 - 172
- Kornberg, A. (1980): *DNA Replikation*. Freeman and Co., San Francisco
- Kraemer, P.M. (1967): Regeneration of Sialic Acid on the Surface of Chinese Hamster Cells in Culture II Incorporation of Radioactivity from Glucosamine-1-C-14. *J. Cell. Physiol.* 69, 199 - 208

- Kuo, K.C., McCune, R.A., Gehrke, Ch. W., Midgett, H.R. und Ehrlich, M. (1980): Quantitative reversed-phase high performance chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucl. Acidx. Res.* 8, 4763 - 4776
- Laval, F., Malaise, E. und Laval, J. (1970): Heterologous DNA Nuclear Uptake by Mouse DNA Fibroblasts in vitro and its early fate. *Exp. Cell Res.* 63, 69 - 77
- Leder, P. Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H, Stward, T. und Taub, R. (1983): Translocation among Antibody Genes in Human Cancer. *Science* 222, 765 - 771
- Lehmann, A.R. und Karran, P. (1981): DNA-Repair. *Int. Rev. of Cytol.* 72, 101 - 146
- Levine, E.M., Becker, Y., Boone, C.W. und Engle, H. (1965): Contact Inhibition, Macromolecular Synthesis and Polyribosomes in cultured human diploid Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 53, 350 - 356
- Lewis, W.H., Srinivasan, P.R., Stokoe, N. und Siminovitch, L. (1980): Parameters governing the Transfer of Genes for Thymidinekinase and Dihydrofolat Reductase into Mouse Cells using Metaphase Chromosomes. *Somatic Cell Genet.* 6, 333 - 348
- Lindahl, T. (1979): DNA Glycosylases, Endonucleases for Apurinic/Apyrimidinic sites, and Base Excision Repair. *Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* 22, 135 - 192
- Lindahl, T. (1982): DNA Repair Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 51, 61 - 87
- Lindahl, T. und Nyberg, B. (1972): Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochem.* 11, 3610 - 3636
- Lindahl, T. und Kahlström, O. (1973): Heat induces Depyrimidation of Deoxyribonucleic Acids in Neutral Solution. *Biochem.* 12, 5151 - 5154
- Lindahl, T. und Nyberg, B. (1974): Heat induced Deamination of Cytosine Residues in Deoxyribonucleic Acid. *Biochem.* 13, 3405 - 3410
- Lindahl, T., Karran, P., Demple, B., Sedgwick, B. und Harris, A. (1982): Inducible DNA-repair enzymes involved in the adaptive response to alkylating agents. *Biochimie* 64, 581 - 583
- Lindberg, U. und Skoog, L. (1970): A Method for the Determination of dATP and dTTP in picomole Amounts. *Anal. Biochem.* 34, 152 - 160
- Lindgren, A., Westermarck, B. und Ponten, J. (1975): Serum Stimulation of stationary Human glia and glioma cells in Culture. *Exp. Cell Res.* 95, 311 - 319
- Loyter, A., Scangos, G.A. und Ruddle, F.H. (1982A): Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: Fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)*. 79, 422 - 426
- Loyter, A., Scangos, G., Juricek, D., Keene, D. und Ruddle, F.H. (1982B): Mechanisms of DNA entry into Mammalian Cells II Phagocytosis of Calcium Phosphate DNA-Coprecipitate visualized by electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 139, 223 - 234

- MacLeod, R.D. (1973): H-3 thymidine labelled DNA in the Primary Root of *Vicia faba* L.. Z. Pflanzenphysiol 68, 379 - 381
- Mannes, W. (1984): Lebensfähigkeit und Teilungsaktivität von immobilisierten tierischen Zellen (BHK 21/C-13). Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Marmur, J. (1961): A Procedure for the Isolation of Desoxyribonucleic Acid from Microorganisms. J. Mol. Biol. 3, 208 - 218
- Mathews, C.K. und Sinah, N. (1982): Are DNA precursors concentrated at replication sites. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 79, 302 - 306
- Messier, B. und Leblond, L.P. (1960): Cell Proliferation and Migration as revealed by Radioautography after Injection of Thymidine-H-3 into Male Rats and Mice. Am. J. Anat. 106, 247 - 264
- Meyer, G. (1980): Treten im Maus-Genom Satellitensequenzen als eingestreute Sequenzen in der 'Hauptbanden DNA' auf ? Schriftliche Hausarbeit vorgelegt im Rahmen der ersten Staatsprüfung für das Lehramt für Sekundarstufe II, Universität Bielefeld.
- Miller, L.L. und Ruddle, F.H. (1978): Co-transfer of human X-linked markers into murine somatic cells via isolated metaphase chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 75, 3346 - 3350
- Morita, T. Tsutsui, Y., Nishiyama, Y., Nakamura, H. und Yoshida, S. (1982): Effects of DNA polymerase inhibitors on replicative and repair DNA synthesis in UV- irradiated Hela cells. Int. J. Radiat. Res. 42, 471 - 480
- Mukherjee, A.B., Orloff, S., Butler, J.D., Triche, T., Lalley, P. und Schulman, J.D. (1978): Entrapment of metaphase chromosomes into Phospholipid vesicles (Lipochromosomes): Carrier potential in gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 75, 1361 - 1365
- Neuman, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, J. und Hofschneider, P.H. (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. 1, 841 - 845
- Nilsson, K., Scheirer, W., Merten, O.W., Östberg, L., Liehl, E., Katinger, H.W.D. und Mosbach, K. (1983): Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules. Nature 302, 629 - 630
- Nunberg, J.H., Kaufman, R.J., Schimke, R.T., Urlaub, G. und Chasin, L.A. (1978): Amplified Dihydrofolate Reductase genes are localized to a homogenously staining region of a single chromosome in a methotrexate resistant Chimes Hamster ovary cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 75, 5553 - 5556
- Nothacker, D. und Hildebrandt, A. (1984): Persönliche Mitteilung.
- Ocho, M., Nakai, S., Tasaka, K., Watanabe, S. und Oda, T. (1981): Microinjection of nucleic acids into cultured mammalian cells by electrophoresis. Acta Med. Okayama 35, 381 - 384
- Ohlbaum, A., Csazi, S., Medveczky, P. und Antoni, F. (1977): Fate of foreign DNA taken up by Tonsillar Lymphocytes. Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. 12, 15 - 23
- Onodera, K. und Sheinin, R. (1970): Macromolecular Glucosamine-containing component of the surface of cultivated Mouse cells. J. Cell Sci. 7, 337 - 355
- Painter, R.B., Umber, J.S. und Young, B.R. (1970): Repair replication in diploid and aneuploid human cells; Normal Replication of repaired DNA after Ultraviolet Irradiation. Radiat. Res. 44, 133-145

- Palm, D., Rambeck, W. und Simon, H. (1968): Tritium Isotopeneffekt der Glucose-6-Phosphat- und 6-Phosphat-gluconat Dehydrogenase. *Z. Naturforschung* 23b, 881 - 887
- Pardee, A. (1974): A restriction Point for control of Normal animal Cell Proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 71, 1286 - 1290
- Pelc, S.R. (1962): Incorporation of Tritiated Thymidine in various Organs of the mouse. *Nature* 193, 793 - 795
- Pelc, S.R. (1968): Turnover of DNA and Function, *Nature* 219, 162 - 163
- Pelc, S.R. (1972): Metabolic DNA in ciliated Protozoa, Salivary Gland Chromosomes, and mammalian Cells. *Int. Rev. Cyt.* 32, 327 - 355
- Pelc, S.R. und Viola-Magni, M.P. (1969): Decrease of labelled DNA of the adrenal medulla after intermitted Exposure to cold. *J. Cell Biol.* 42, 460 - 468
- Pellicer, A., Robins, D., Wold, B., Sweet, R., Jackson, J., Lowy, I., Roberts, J.M., Sim, G.K., Silverstein, S. und Axel, R. (1980): Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. *Science* 209, 1414 - 1422
- Pietrzak-Flis, Z., Radwan, I. und Indeka, L. (1978): Tritium in Rabbits after ingestion of freeze dried tritiated food and tritiated water. *Radiat. Res.* 76, 420 - 428
- Pietrzak-Flis, Z., Radwan, I., Major, Z. und Kowalska, M. (1982) Tritium incorporation in Rats chronically exposed to tritiated food and tritiated water for three successive generations. *J. Radiat. Res.* 22, 434 - 442
- Potter, S.S. (1984): Rearranged sequences of a human Kpn I fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 81, 1012 - 1016
- Prescott, D.M. (1968): Regulation of cell reproduction. *Cancer Res.* 28, 1815 - 1820
- Radding, C.M. (1978): Genetic recombination: Strand transfer and mismatch repair. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 847 - 880
- Raizada, M.K., Tan, G. und Fellows, R.E. (1981): Trypsin induced alterations of Insulin binding, microfilament organization and cell shape in Fibroblastic cultures from non-diabetic and diabetic mice. *Exp. Cell Res.* 133, 261 - 271
- Reddy, G.P.C. und Pardee, A. (1980): Multienzyme complex for metabolic channelling in mammalian DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 77, 3312 - 3316
- Reinis, S. (1975): Incorporation of H-3 Thymidine into brain DNA after cerebellum damage. *Pediat. Res.* 9, 807 - 811
- Revel, J.R., Koch, P. und Ho, R. (1974): Adhesion of cultured cells to their substratum. *Exp. Cell Res.* 84, 207 - 218
- Roberts, J.M., Buck, L.B. und Axel, R. (1983): A structure of amplified DNA. *Cell* 33, 53 - 63
- Rossini, M., Liu, J.C. und Baserga, R. (1976): Effects of prolonged quiescence on nuclei and chromatin of WI-38 Fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 88, 1 - 12
- Rovera, G. und Baserga, R. (1973): Effect of nutritional changes on chromatin template activity and Non-Histone chromosomal protein synthesis in WI-38 and 3T6 Cells. *Exp. Cell Res.* 78, 118 - 126

- Rozengurt, E. und Sinnett-Smith, J. (1983): Bombesin Stimulation of DNA-synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 80, 2936 - 2940
- Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N. und Tonegawa, S. (1984): Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from DNA-sequences. *Nature* 309, 757 - 762
- Sampson, W. und Davies, D.D. (1967): Synthesis of a metabolically labile DNA in the maturing root cells of *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* 43, 669 - 673
- Sander, G. und Pardee, A.B. (1972): Transport changes in synchronously growing CHO and L cells. *J. Cell. Physiol.* 80, 267 - 272
- Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P.H. (1982): Liposomes as gene carriers: Efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase genes. *Science* 215, 166 - 168
- Schaer, J.C. und Maurer, U. (1982): Thymidien nucleotide synthesis and catabolism by CHO cells and their changes during the cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 697, 221 - 228
- Schimke, R.T. (1982) Gene Amplifikation, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schnieke, A., Harbers, K. und Jaenisch, R. (1983): Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the  $\alpha 1(I)$  collagen gene. *Nature* 304, 315 - 320
- Shapiro, J.A. (1983): Mobile Genetic Elements, Academic Press, New York.
- Sharp, P.A. (1983): Conversion of RNA to DNA in mammals: Alu-like elements and pseudogenes. *Nature* 301, 472 - 473
- Sliatly, S.N. und Aposhian, H.V. (1983): Gene transfer by Polyoma-like particles assembled in a cell-free System. *Science* 220, 725 - 727
- Smerdon, M.J., Tlsty, T.D. und Lieberman, M.W. (1978): Distribution of Ultraviolet-induced DNA repair synthesis in nuclease sensitive and resistant regions of human chromatin. *Biochem.* 17, 2377 - 2386
- Smerdon, M.J. und Lieberman, M.W. (1980): Distribution within chromatin of Deoxyribonucleic Acid repair synthesis occurring at different times after Ultraviolet radiation. *Biochem.* 19, 2992 - 3000
- Smith, C.A. und Hanawalt, P.C. (1976A): Repair replication in human cells simplified determination utilizing Hydroxyurea. *Biochim. Biophys. Acta* 432, 336 - 347
- Smith, C.A. und Hanawalt, P.C. (1976B): Repair replication in cultured normal and transformed human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 447, 121 - 132
- Smith, C.A., Cooper, P.K. und Hanawalt, P.C. (1981): Measurement of repair replication by equilibrium sedimentation. In: DNA repair Friedberg, E. und Hanawalt, P.C. (eds.), Marcel Dekker Inc. New York
- Smith, J.A. und Martin, L. (1973): Do cells cycle? *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 70, 1263 - 1267
- Snow, M.H.L. und McLaren, A. (1974): The effect of exogenous DNA upon cleaving mouse embryos. *Exp. Cell Res.* 86, 1 - 8
- Snyder, R.D. und Regan, J.D. (1982): Differential response of log and stationary phase human fibroblasts to inhibition of DNA-repair by Aphidicolin. *Biochim. Biophys. Acta* 697, 229 - 234

- Spradling, A.C. und Mahowald, A.P. (1981): A chromosome inversion alters the pattern of specific DNA-replication in *Drosophila* follicle cells. *Cell* 27, 203 - 209
- Stark, G.R. und Wahl, G.M. (1984): Gene Amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 447 - 491
- Stern, D.B. und Palmer, J.D. (1984): Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 81, 1946 - 1950
- Stroun, M., Charles, P., Anker, P. und Pelc, S.R. (1967): Metabolic DNA in heart and skeletal muscle and in the intestine of mice. *Nature* 216, 716 - 718
- Stryer, L. (1981): *Biochemistry*, Freeman and Co. San Francisco
- Sturelid, S. (1971) Chromosome rearing capacity of *Tepa* and analogues in *Vicia faba* and Chinese hamster cells. *Hereditas* 68, 255 - 275
- Tang, M.S., Wang, T.C. und Patrick, M.H. (1979): DNA-turnover in buffer held *Escherichia coli* and its effect on repair of UV damage. *Photochem. Photobiol.* 29, 511 - 520
- Temin, H.M. (1971): Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells. *J. Cell. Physiol.* 78, 161 - 170
- Todaro, G.J. und Lazar, G.K. und Green, H. (1965): The initiation of cell division in a contact inhibited mammalian cell line. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 66, 325 - 334
- Tonegawa, S. (1983): Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575 - 581
- Ueno, A.M. (1974): Incorporation of tritium from tritiated water into nucleic acids of *Oryzias latipes* eggs. *Radiat. Res.* 59, 629 - 637
- VanBruwaene, R., Gerber, G.B., Kirchmann, R., Van den Hoek, J. und Vanderkom, J. (1982): Tritium metabolism in young pigs after exposure of the mothers to tritium oxide during pregnancy. *Radiat. Res.* 91, 124 - 134
- Vincent, R.A. und Huang, P.C. (1977): The proportion of cells labeled with tritiated thymidine as a function of population doubling level in cultures of fetal, adult, mutant and tumor origin. *Exp. Cell Res.* 102, 31 - 42
- Vogel, K.G. (1978): Effects of Hyaluronidase, trypsin and EDTA on surface composition and topography during detachment of cells in culture. *Exp. Cell Res.* 113, 345 - 357
- Wahl, G., Padgett, R. und Stark, G. (1979): Gene amplification causes overproduction of the first three enzymes on UMP-synthesis in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate resistant hamster cells. *J. Biol. Chem.* 254, 8679 - 8689
- Wahl, G.M., deSaint Vincent, B.R. und DeRose, M.L. (1984): Effects of chromosomal position on amplification of transfected genes in animal cells. *Nature* 307 516 - 520
- Watson, J.D., Tooze, J. und Kurtz, D.T. (1983): *Recombinant DNA, A short course*, Freeman and Co., New York
- Watts, J.W. und Harris, H. (1959): Turnover of Nucleic Acids in Non-multiplying animal cells. *Biochem. J.* 72, 147 - 152

- White, A., Handler, P. und Smith, E.L. (1973): Principles of Biochemistry. McGraw-Hill, Kogakusha, Ltd. Tokyo.
- Whur, P., Koppel, H., Urquhart, C.M. und Williams, D.C. (1977): Substrate retention of fractured retraction fibres during detachment of trypsinized BHK 21 fibroblasts. J. Cell Sci. 24, 265 - 273
- Wiebel, F. und Baserga, R. (1969): Early alterations in amino acid pools and protein synthesis of diploid fibroblasts stimulated to synthesize DNA by addition of serum. J. Cell. Physiol. 74, 191 - 202
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, Y.C. und Axel, R. (1977): Transfer of purified Herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell 11, 223 - 232
- Wigler, M. Pellicer, A., Silverstein, S. und Axel, R. (1978): Biochemical transfer of single copy eukaryotic genes using total cellular DNA as donor. Cell 14, 725 - 731
- Wigler, M., Sweet, R., Sim, G.K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S. und Axel, R. (1979A): Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes. Cell 16, 777 - 785
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. und Chasin, L. (1979B): Introduction and expression of a rabbit  $\beta$  globin gene in mouse fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 76, 1373 - 1376
- Winzerith, M. Wittendorp, E., Rechenmann, R.V. und Mandel, P. (1977): Nuclear, nucleolar repair or turnover of DNA in adult rat brain. J. Neurosc. Res. 3, 217 - 230
- Wold, B., Wigler, M., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S. und Axel, R. (1979): Introduction and expression of a rabbit  $\beta$  globin gene in mouse fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 76, 5684 - 5688
- Yajko, D.M. und Weiss, B. (1975): Mutations simultaneously affecting endonuclease II and Exonuclease III in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 72, 688 - 692
- Yeh, J. und Fischer, H.W. (1969): A diffusible factor which sustains contact inhibition of replication. J. Cell Biol. 40, 382 - 388
- Zipfel, P.F. (1980): Bestimmung der spezifischen Aktivität von Tritium und Kohlenstoff-14 in der DNA von tierischen Zellen und deren biologische Folgen, in Abhängigkeit von der Quelle. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen.
- Zipfel, P.F., Kasche, V., Zöllner, R., Amneus, H. und Näslund, L. (1981): DNA-turnover in nonproliferating tissues. Rad. Environm. Biophys. 19, 306
- Zipfel, P.F. und Kasche, V. (1982): Specific Activity of H-3 and C-14 in DNA of mouse tissues, during and after chronic exposure to inorganic (HTO) and organic (glucose) precursors of DNA. Colloquium on the Toxicity of Radionuclides, Liège, 19 - 20 Nov. 1982
- Zipfel, P.F., Dittmer, J., Kasche, V. und Zöllner, R. (1982A): Importance of DNA-turnover for induced DNA Repair. Poster präsentiert beim Symposium: Molekulare und zelluläre Mechanismen der Wirkunk ionisierender Strahlen, München, Neuherrberg.
- Zipfel, P.F., Dittmer, J., Kasche, V. und Amneus, H. (1982B): DNA-turnover in cultured animal cells : Hoppe Seyler's Zeitsch. Physiol. Chem. 363, 937
- Zipfel, P.F., Dittmer, J., Telle, W. und Kasche, V. (1984): Lysis and Permeabilization of BHK 21 cells by detachment from their substrates using trypsin and other proteolytic enzymes. Manuskript in Vorbereitung.

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Volker Kasche möchte ich für seine vielfältigen Anregungen und seine hilfreiche Kritik mit der er das Entstehen dieser Arbeit erleichtert hat, herzlichst danken.

Herrn Dr. Herman Amneus, Institut für Genetik und Pflanzenzüchtung, Universität Uppsala, danke ich für die Zusammenarbeit, die es ermöglichte, einen Teil der Experimente in seinem Labor durchzuführen.

Frau Christine Brandt danke ich für ihre Unterstützung insbesondere bei der technischen Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Jürgen Dittmer und Herrn Wolfram Telle möchte ich für ihre kooperative Zusammenarbeit beim Nachweis der Zellschädigung danken.

Frau Roswitha Zöllner danke ich für ihre Mithilfe bei der experimentellen Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA von Mäusegeweben.





